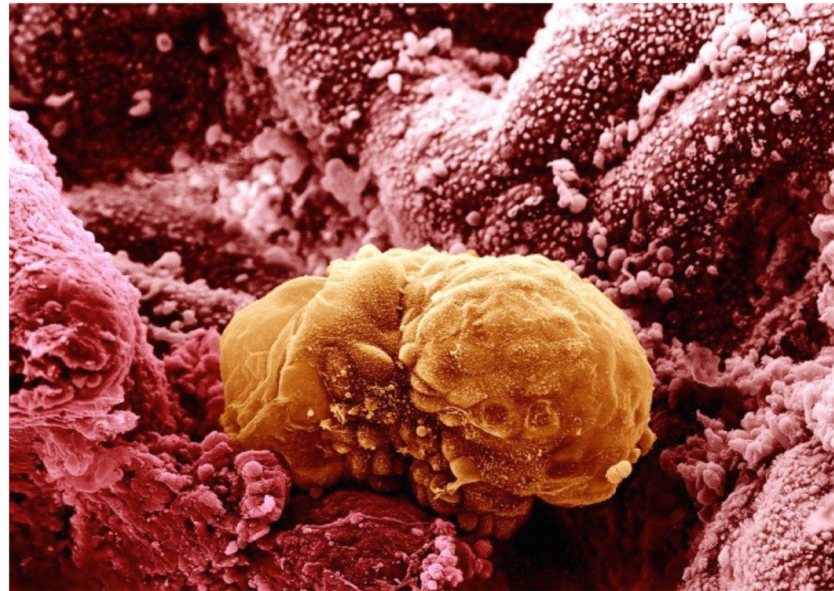

Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement

Recherche de marqueurs prédictifs de l'implantation embryonnaire humaine



Laure NOEL

Master en Médecine

Promotrices

Pr Michelle Nisolle

Dr Carine Munaut

**Thèse de doctorat en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Médicales**

Année académique 2019-2020

Ce manuscrit représente l'aboutissement de six années de doctorat. Ce travail de recherche « à mi-temps » a représenté un incroyable défi pour l'assistante puis la gynécologue que je suis devenue, et il aurait été impossible sans le soutien des personnes que j'ai rencontrées au laboratoire et à l'hôpital, de ma famille et de mes amis. Par ces quelques lignes, je souhaite les remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse qui ont relu et commenté ce travail, et en particulier les Professeurs Isabelle Demeestere et Mona Rahmati, qui ont accepté de se déplacer pour participer aux défenses orales.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers le Professeur Jean-Michel Foidart, le Professeur Michelle Nisolle et le Docteur Carine Munaut, qui ont été mes mentors tout au long de ce travail et de mon assistanat en gynécologie-obstétrique.

Professeur Foidart, cela a été un privilège de bénéficier de vos précieux conseils, de votre intérêt insatiable pour la recherche, de votre optimisme et de vos réflexions toujours pertinentes concernant l'orientation de ce travail. J'ai beaucoup aimé travailler avec vous et je vous remercie de m'avoir accordé une partie de votre précieux temps, malgré vos très nombreuses obligations. Votre soutien est inestimable.

Professeur Nisolle, je tiens à vous remercier, non seulement en tant que promotrice de ce travail de doctorat, mais aussi en tant que chef de service de gynécologie. C'est grâce à vous que j'ai pu mener de front les deux « métiers » très prenants de médecin et de chercheur. Vous m'avez appris les bases de la chirurgie coelioscopique et avez même filmé ma toute première intervention. Je tiens à vous remercier sincèrement d'avoir supervisé ce doctorat et mes cinq années de formation en gynécologie, et de continuer à soutenir mes nouveaux projets. Je suis très heureuse de faire partie de votre équipe.

Docteur Munaut, Carine, co-promotrice de ce travail, je tiens à te remercier tout particulièrement pour ton soutien quotidien dans mon travail au laboratoire. Je n'avais aucune connaissance et aucune expérience en recherche quand j'ai débuté ce doctorat. Ton accueil, ta confiance et ton soutien inébranlable m'ont permis d'apprendre une multitude de techniques et de mener à bien ce projet. Merci d'avoir manipulé pour moi et avec moi, merci de m'avoir appris ce qu'était une belle présentation et de m'avoir offert tous ces cafés plus que nécessaires. Plus sérieusement, merci de m'avoir donné le goût de la recherche.

Je souhaite ensuite remercier le Docteur Fransolet. Maité, tu es une chercheuse extraordinaire, méticuleuse et organisée. C'est toi qui m'as appris la culture cellulaire et qui a pris soin de nos précieuses cellules de la granulosa. C'est aussi toi qui étais toujours disponible pour me remplacer en lendemain de garde, parce que la recherche n'est pas un travail à « mi-temps ». Cela a été un réel plaisir de travailler avec toi.

J'aimerais aussi remercier tous les membres du laboratoire, et en particulier le Professeur Agnès Noël, pour son accueil, ses conseils et sa gentillesse. J'adresse également un merci tout particulier à Erika Konradowski et à Nathalie Lefin, deux techniciennes avec lesquelles j'ai eu la chance de travailler. Votre compétence et votre aide m'ont été indispensables. Merci pour toutes ces PCR et tous ces ELISA.

Remerciements

J'adresse un merci tout particulier à Nathalie Jacobs qui m'a expliqué les bases de la cytométrie de flux et m'a si bien guidée dans l'analyse des résultats. Merci également à Raafat Stephan qui m'a aidé à apprivoiser les cytomètres de flux.

Ce travail a été réalisé en collaboration étroite avec le centre de procréation médicalement assistée de l'Université de Liège, où j'ai la chance de travailler aujourd'hui comme gynécologue. Merci à ma chef et amie, le Docteur Laurie Henry, à sa chef adjointe, le Professeur Sophie Perrier d'Hauterive, et à notre ancien chef le Professeur Dubois, pour leur accueil, leur soutien et leur apprentissage clinique. Merci au Docteur Caroline Jouan, et à tous les biologistes Fabienne, Frédérique, Olivier, Soraya, Stéphanie, Virginie et aux techniciens, d'avoir participé activement au recueil des fluides folliculaires et au suivi des embryons qui ont permis de réaliser ce travail. Merci également aux infirmières de l'équipe, à notre aide-soignante et à toutes mes collègues médecins pour leur soutien, leur bonne humeur et leur présence au quotidien. Je suis très honorée de faire partie de cette belle équipe.

Pour terminer, je souhaite exprimer toute ma gratitude envers ma famille, Maman, Lise et Brice, ainsi que ma Bonne-maman, pour leur soutien et leur amour inconditionnels. J'ai énormément de chance d'être si bien entourée. Maman, c'est grâce à ta force que je suis devenue la personne que je suis aujourd'hui. Lise et Brice, vous aurez toujours une place à part dans ma vie, malgré la distance géographique. Je suis très fière de ce que vous avez tous les deux accomplis dans vos carrières de chercheurs. J'ai beau être la grande sœur, je peux toujours compter sur vos précieux conseils. J'adresse également un merci tout particulier à mes meilleurs amis qui sont ma deuxième famille. Yan, Line, Gavriil et Flo, merci d'être toujours là pour moi, et en particulier, pendant la finalisation de ce travail de doctorat et la rédaction de ma thèse.

Ces travaux ont été réalisés grâce au soutien financier du Fonds National de la Recherche Scientifique et de la Fondation Léon Fredericq.

ADN : acide désoxyribonucléique
 AMH : hormone anti-mullérienne
 AREG : amphiréguline
 ARN (ARNm / miARN ou miR) : acide ribonucléique (ARN messenger / micro ARN)
 ASRM : Société américaine de médecine de la reproduction
 BELRAP : Registre belge de procréation assistée
 BMP-15 : bone morphogenetic protein 15
 CAMK1D : calcium/calmodulin-dependent protein kinase 1D
 CCS : comprehensive chromosome screening ou analyse de l'ensemble des chromosomes
 CFA : compte folliculaire antral
 CGH array : Comparative Genomic Hybridization array
 COC : complexe cumulo-ovocytaire
 COH : hyperstimulation ovarienne contrôlée
 CPMA : Centre de Procréation Médicalement Assistée
 CSF : colony stimulating factor
 CXCL13 : C-X-C motif chemokine 13
 DC : cellules dendritiques
 E2 : oestradiol
 EFNB2 : ephrin-B2
 ERA : endometrial receptivity analysis
 ESHRE : Société européenne de reproduction humaine et d'embryologie
 FF : fluide folliculaire
 FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
 FIV : fécondation *in vitro*
 FSH : hormone folliculo-stimulante
 G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor
 G-CSFR : récepteur du G-CSF
 GDF-9 : growth differentiation factor 9
 GM-CSF : granulocyte macrophage-colony stimulating factor
 GnRH : hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
 GRO α : growth-regulated oncogene alpha
 HB-EGF : heparin-binding epidermal growth factor
 hCG : hormone chorionique gonadotrope humaine
 hGC : cellules de granulosa humaines lutéinisées
 HGL5 : lignée de cellule de granulosa humaine
 ICSI : injection intracytoplasmique de spermatozoïde
 IFN : interféron
 IIU : insémination intra-utérine
 IL : interleukine
 IMC : indice de masse corporelle
 KIR : killer-cell immunoglobulin-like receptor
 LH : hormone lutéinisante
 LIF : leukemia inhibitory factor
 MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1
 M-CSF : macrophage-colony stimulating factor
 MHC : complexe majeur d'histocompatibilité
 MMP : métalloprotéinase
 NGS : séquençage de nouvelle génération
 NK : cellules natural killer
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 (ni)PGT-A : diagnostic génétique préimplantatoire des aneuploïdies (non invasif)
 PGT-M : diagnostic génétique préimplantatoire des maladies monogéniques
 PMA : procréation médicalement assistée
 qPCR : PCR quantitative
 RCT : étude randomisée contrôlée
 rhG-CSF : G-CSF humain recombinant
 ROC : receiver operating characteristic
 ROS : espèces réactives de l'oxygène
 SASH1 : SAM and SH3 domain-containing protein 1

Liste des abréviations

SCF : stem cell factor

SERM : modulateur sélectif des récepteurs aux oestrogènes

SOMPK : syndrome des ovaires micropolykystiques

T : testostérone

TGF- β : transforming growth factor- β

TNF : tumor necrosis factor

VEGF : vascular endothelial growth factor

VPP/VPN : valeur prédictive positive/négative

Ce travail s'intéresse à un nouveau marqueur de qualité ovocytaire et de sélection embryonnaire en FIV, le G-CSF folliculaire. La sélection de l'embryon à transférer est basée sur une évaluation morphologique, qui reste subjective et imparfaite. L'intérêt d'un marqueur permettant d'identifier l'embryon ayant le potentiel implantatoire le plus élevé est, d'une part, de diminuer le délai nécessaire à l'obtention d'une grossesse et, d'autre part, de favoriser les transferts d'embryon unique. En effet, l'implantation de l'embryon reste le facteur limitant le succès de la FIV. Certains couples infertiles sont ainsi confrontés à une répétition de transferts infructueux avant d'obtenir une grossesse, ainsi qu'au choix difficile du nombre d'embryons à transférer. Choisir de réimplanter deux (ou plusieurs) embryons permet effectivement d'augmenter la probabilité d'obtenir une grossesse à l'issue du transfert, mais au prix d'un taux élevé de grossesses multiples associées à de plus nombreuses complications. Le développement d'un nouveau marqueur de sélection embryonnaire reste un challenge à l'heure actuelle.

Les recherches menées au cours de ce travail ont été scindées en deux parties. D'une part, nous avons étudié un nouvel ELISA ultra-sensible et spécifiquement dédié au dosage du G-CSF folliculaire. Cet outil, peu coûteux et simple d'emploi, a été évalué dans deux études observationnelles. Dans la première étude multicentrique, la probabilité d'implantation était plus élevée pour la catégorie d'embryons issus d'un fluide folliculaire (FF) avec un taux de G-CSF élevé, mais les résultats n'étaient pas significatifs. Cela s'explique probablement par une variabilité de la technique de ponction ovocytaire entre les centres, ce qui souligne l'importance d'une standardisation des pratiques. En effet, la différence de taux d'implantation entre les catégories d'embryons était plus prononcée si les résultats d'un seul centre étaient pris en compte. La seconde étude unicentrique a montré que ce marqueur était indépendant d'autres facteurs utilisés pour évaluer la qualité ovocytaire, c'est-à-dire le volume du follicule et la maturité nucléaire de l'ovocyte, et a confirmé le taux d'implantation augmenté des embryons issus d'un FF avec un taux de G-CSF élevé.

D'autre part, nous avons étudié l'origine du G-CSF folliculaire. Nos résultats ont montré que la production de G-CSF par les cellules de la granulosa était fortement induite par la coculture avec des leucocytes. Cet effet était maximal quand les leucocytes provenaient du sang de patientes témoins en fin de phase folliculaire, juste avant l'ovulation. De plus, la production de G-CSF était significativement majorée quand les leucocytes étaient isolés à partir du FF par rapport au sang de patientes suivies en FIV. La proportion de granulocytes était accrue au niveau du FF par rapport au sang correspondant. Ainsi, l'augmentation du G-CSF folliculaire au moment de l'ovulation coïncide avec une accumulation de granulocytes au niveau du FF. Le rôle des leucocytes, et en particulier des granulocytes, en tant qu'acteurs de l'ovulation est de plus en plus reconnu. Des taux élevés de G-CSF pourraient être observés dans les follicules matures où l'interaction entre les cellules de granulosa et les leucocytes est optimale. Ceci pourrait expliquer le meilleur taux d'implantation des embryons issus des FF avec un taux de G-CSF élevé.

En conclusion, ce travail a contribué à l'évaluation du G-CSF folliculaire en tant que marqueur de qualité ovocytaire. Avant d'être utilisé en routine clinique, ce nouveau marqueur devra être évalué dans des études prospectives interventionnelles, où la sélection de l'embryon sera basée sur la combinaison de la morphologie et du taux de G-CSF folliculaire.

This work focuses on a new biomarker of oocyte quality and embryo selection in IVF, namely follicular G-CSF. Embryo selection is currently based on a morphological assessment, which remains subjective and suboptimal. A new biomarker of embryo implantation potential would decrease the time before achieving a pregnancy as well as the rate of multiple embryo transfers. As a matter of fact, embryo implantation is the main factor limiting IVF success nowadays. Thus infertile couples may face a series of failed embryo transfers before achieving a pregnancy. Moreover they have to choose between a single or a multiple embryo transfer, which enhances the pregnancy rate while increasing the rate of multiple pregnancies and their associated complications. To date, the development of a new biomarker of embryo selection remains a challenge.

This work was divided into two parts:

On the one hand, we conducted two clinical studies to assess the performance of a new and ultra-sensitive ELISA assay, that was specifically designed for the quantification of follicular G-CSF. This ELISA is both affordable and practical in clinical settings. The first multicentric clinical trial confirmed the previously described higher implantation rate of embryos originating from follicular fluids (FF) with a high G-CSF level. However the results were not statistically significant due to discrepancies in the FF collection methods among the fertility centers, leading to variable FF dilutions and mean G-CSF concentrations. Thus this study highlighted the importance of a standardisation of the FF collection technique. The second single-center clinical trial showed that follicular G-CSF was independent of both follicular volume and oocyte nuclear maturity, that are commonly used as markers of oocyte quality in IVF. This study also confirmed that embryos derived from FF with a high G-CSF level showed increased implantation rates.

On the other hand, we investigated the source of follicular G-CSF production. We demonstrated that G-CSF secretion by ovarian granulosa cells was significantly increased in cocultures with leukocytes. This effect was maximal when leukocytes were isolated from the blood of women in the late follicular phase of the menstrual cycle or from the FF of women undergoing IVF. The leukocyte population isolated from the FF samples of women undergoing IVF showed a higher proportion of granulocytes than that isolated from the corresponding blood samples. The pronounced rise in G-CSF at the time of ovulation coincides with the accumulation of follicular granulocytes. There is growing evidence that leukocytes, and especially granulocytes, are involved in the mechanism of ovulation. Therefore high follicular G-CSF concentrations may occur in follicles with optimal granulosa-leukocyte interactions, which could explain the increased implantation rate of embryos arising from these follicles.

In conclusion, this work contributed to the evaluation of follicular G-CSF as a biomarker of oocyte quality. Further interventional prospective clinical trials must be conducted before implementing this new biomarker in addition to embryo morphology assessment in routine clinical practice.

Table des matières

Introduction.....	1
1. Reproduction féminine.....	3
1.1. Ovogenèse, folliculogenèse et cycle menstruel.....	3
1.1.1. <u>Ovogenèse</u>	3
1.1.2. <u>Folliculogenèse et cycle menstruel</u>	3
1.2. Ovulation et inflammation.....	9
1.2.1. <u>Hypothèse d'Espey</u>	9
1.2.2. <u>Mécanisme de l'ovulation</u>	9
1.2.3. <u>Distribution spatio-temporelle des leucocytes au sein de l'ovaire humain</u>	10
1.2.4. <u>Implication des leucocytes dans la physiologie ovarienne</u>	11
1.2.5. <u>Implication des cytokines et chémokines dans la physiologie ovarienne</u>	13
1.3. Fécondation et embryogenèse précoce.....	13
1.4. Implantation.....	14
1.5. Réponse immunologique de l'endomètre au cours de l'implantation et de la grossesse.....	16
1.6. Evaluation de la réceptivité endométriale en clinique.....	18
2. Infertilité.....	20
2.1. Définitions.....	20
2.2. Bilan initial du couple infertile.....	21
2.3. Techniques de procréation médicalement assistée.....	23
2.4. Fécondation in vitro.....	24
2.4.1. <u>Hyperstimulation ovarienne contrôlée</u>	25
2.4.2. <u>Ponction ovocytaire et recueil des spermatozoïdes</u>	27
2.4.3. <u>Fécondation et culture embryonnaire</u>	27
2.4.4. <u>Transfert d'embryon(s) frais</u>	28
2.4.5. <u>Transfert d'embryon(s) cryopréservé(s)</u>	29
2.4.6. <u>Effets secondaires</u>	29
2.4.7. <u>Evaluation des résultats de la FIV</u>	30
2.4.8. <u>Résultats des centres de fertilité belges</u>	30
3. Sélection embryonnaire.....	32
3.1. Evaluation séquentielle de la morphologie embryonnaire.....	33
3.1.1. <u>Etapes du développement embryonnaire de la fécondation à l'implantation</u>	33
3.1.2. <u>Critères d'évaluation des zygotes (16-20 hpi) et timing du premier clivage embryonnaire</u>	34
3.1.3. <u>Critères d'évaluation morphologique des embryons à J2 et J3</u>	34
3.1.4. <u>Gradation morphologique des embryons au stade de clivage (J2-J3)</u>	35
3.1.5. <u>Critères d'évaluation morphologique des blastocystes à J5 et J6</u>	36
3.1.6. <u>Intérêts de la culture embryonnaire prolongée</u>	36
3.2. Evaluation continue de la morphologie embryonnaire.....	38

3.3. <i>Evaluation de la morphologie ovocytaire.....</i>	38
3.4. <i>Evaluation de biomarqueurs au niveau des cellules de la granulosa et du cumulus oophorus.....</i>	39
3.5. <i>Evaluation de biomarqueurs au niveau du fluide folliculaire (FF)</i>	40
3.6. <i>Evaluation de biomarqueurs au niveau du milieu de culture des embryons.....</i>	41
3.7. <i>Evaluation de biomarqueurs au niveau du fluide blastocélique.....</i>	42
3.8. <i>Diagnostic génétique préimplantatoire des aneuploïdies</i>	43
4. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) et fertilité.....	46
4.1. <i>Généralités sur le G-CSF et son récepteur (G-CSFR)</i>	46
4.2. <i>G-CSF et ovulation</i>	47
4.3. <i>G-CSF et implantation embryonnaire</i>	48
4.4. <i>G-CSF et endomètre mince.....</i>	51
4.5. <i>G-CSF et fausses couches à répétition</i>	52
4.6. <i>G-CSF et échecs d'implantation répétés.....</i>	53
4.7. <i>G-CSF et protection ovarienne</i>	54
4.8. <i>Sécurité d'emploi du G-CSF</i>	54
Buts et plan du travail	55
Résultats	59
1. Développement et évaluation de la performance d'un ELISA ultra-sensible et spécifique du G-CSF folliculaire	61
1.1. <i>Introduction.....</i>	61
1.2. <i>Résultats.....</i>	62
1.3. <i>Discussion.....</i>	63
2. Evaluation d'une corrélation entre le taux de G-CSF folliculaire mesuré par un ELISA ultra-sensible et le volume du follicule.....	64
2.1. <i>Introduction.....</i>	64
2.2. <i>Résultats.....</i>	64
2.3. <i>Discussion.....</i>	65
3. Recherche de l'origine du G-CSF folliculaire et des mécanismes responsables de sa production au niveau du follicule pré-ovulatoire	67
3.1. <i>Introduction.....</i>	67
3.2. <i>Résultats.....</i>	67
3.3. <i>Discussion.....</i>	68

Discussion.....	69
1. Méthodes de sélection embryonnaire	71
2. Intérêt du G-CSF dans la prise en charge de l'infertilité.....	80
Perspectives.....	83
1. Intérêt du G-CSF folliculaire comme marqueur de sélection embryonnaire	85
2. Intérêt du G-CSF dans la prise en charge de l'infertilité.....	85
Conclusion	87
Bibliographie.....	91

Introduction

1. Reproduction féminine

1.1. *Ovogenèse, folliculogenèse et cycle menstruel*

1.1.1. Ovogenèse

L'ovogenèse est le processus par lesquels les ovogonies, issues des cellules germinales primordiales de l'embryon après leur migration vers la future gonade, se multiplient et se différencient en ovocytes matures. Comme les cellules somatiques, les ovogonies sont diploïdes et contiennent 23 paires de chromosomes (soit 46 chromosomes). Suite à une séquence de 2 divisions cellulaires appelée méiose, ce nombre de chromosomes sera réduit de moitié au niveau des ovocytes matures, qui sont donc haploïdes et contiennent un chromosome de chaque paire (soit 23 chromosomes).

Dès qu'elles arrêtent leurs multiplications par mitoses, les ovogonies deviennent des ovocytes primaires qui débutent la 1^{ère} division méiotique entre le 3^{ème} et le 5^{ème} mois de la vie fœtale. Cependant, cette 1^{ère} division méiotique s'arrête au stade de la prophase chez les ovocytes primaires ; leurs noyaux deviennent volumineux et sont appelés vésicules germinales. La division méiotique ne reprendra qu'après la puberté et l'initiation des cycles menstruels. Seuls les ovocytes des follicules dominants pourront terminer cette première méiose, au moment de l'ovulation. Chaque ovocyte primaire s'entoure d'une couche de cellules épithéliales aplaties, les cellules folliculaires, pour constituer un follicule primordial. Le stock de follicules primordiaux est maximal au 5^{ème} mois de la vie fœtale, où il atteint environ 7 millions de follicules. Ce stock chute rapidement pour atteindre 700.000 à 2 millions à la naissance et environ 400.000 à la puberté suite à une atrophie folliculaire. Ces follicules primordiaux peuvent rester quiescents pendant des décennies [1-3].

1.1.2. Folliculogenèse et cycle menstruel

La folliculogenèse correspond à la croissance et à la maturation d'un follicule primordial jusqu'au stade de follicule pré-ovulatoire contenant un ovocyte mature (Figure 1). Cette folliculogenèse se divise en 2 étapes : la 1^{ère} phase est indépendante des gonadotrophines et dure environ 120 jours (recrutement initial), alors que la 2^{ème} phase est sous la dépendance des gonadotrophines (recrutement cyclique). La 1^{ère} phase correspond au recrutement de follicules primordiaux quiescents, qui deviennent successivement des follicules primaires puis secondaires ou pré-antraux. La 2^{ème} phase correspond à la croissance des follicules pré-antraux pour atteindre le stade antral qui dure environ 70 jours, puis à la sélection du follicule dominant qui évoluera jusqu'au stade pré-ovulatoire lors de la phase folliculaire d'un cycle menstruel. Les autres follicules recrutés subiront un phénomène d'atrophie. L'entrée en croissance de follicules primordiaux commence chez le fœtus et se poursuit tout au long de la vie reproductive. Il y a plusieurs vagues de recrutement tous les mois. Ces vagues sont responsables d'une diminution progressive de la réserve de follicules primordiaux, jusqu'à l'installation de la ménopause quand ce pool ne compte plus que 1000 follicules environ. Ainsi, seuls 400 à 500 follicules primordiaux en moyenne donneront une ovulation au cours de la vie reproductive d'une femme.

Le follicule primordial (35 μm de diamètre) est constitué d'un ovocyte primaire entouré d'une seule couche de cellules de granulosa aplaties et d'une membrane basale, alors que le follicule primaire (46 μm de diamètre) est entouré d'une couche de cellules de granulosa cuboïdes. A ce stade, l'ovocyte synthétise des glycoprotéines qui forment une couche péri-ovocytaire appelée zone pellucide. La transition vers le stade secondaire ou pré-antral (120-200 μm de diamètre) est marquée par la formation d'une double couche de cellules de granulosa qui expriment le récepteur de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et par le recrutement de cellules stromales ovariennes, qui s'alignent autour de la membrane basale pour former la thèque. Celle-ci se différencie en 2 couches vascularisées, la thèque interne, formée de cellules stéroïdogènes qui expriment le récepteur de l'hormone lutéinisante (LH), et la thèque externe, formée de fibroblastes (Figure 1).

Le follicule antral (2-5 mm de diamètre) est caractérisé par l'apparition, au sein de la granulosa, de petites cavités remplies de liquide, qui se réunissent pour former un antrum central contenant le fluide folliculaire (FF). Les cellules de la granulosa se différencient en cellules murales qui bordent la membrane basale et la cavité antrale, et en cellules du cumulus oophorus qui entourent l'ovocyte et l'attachent aux cellules de la granulosa murales (Figure 1).

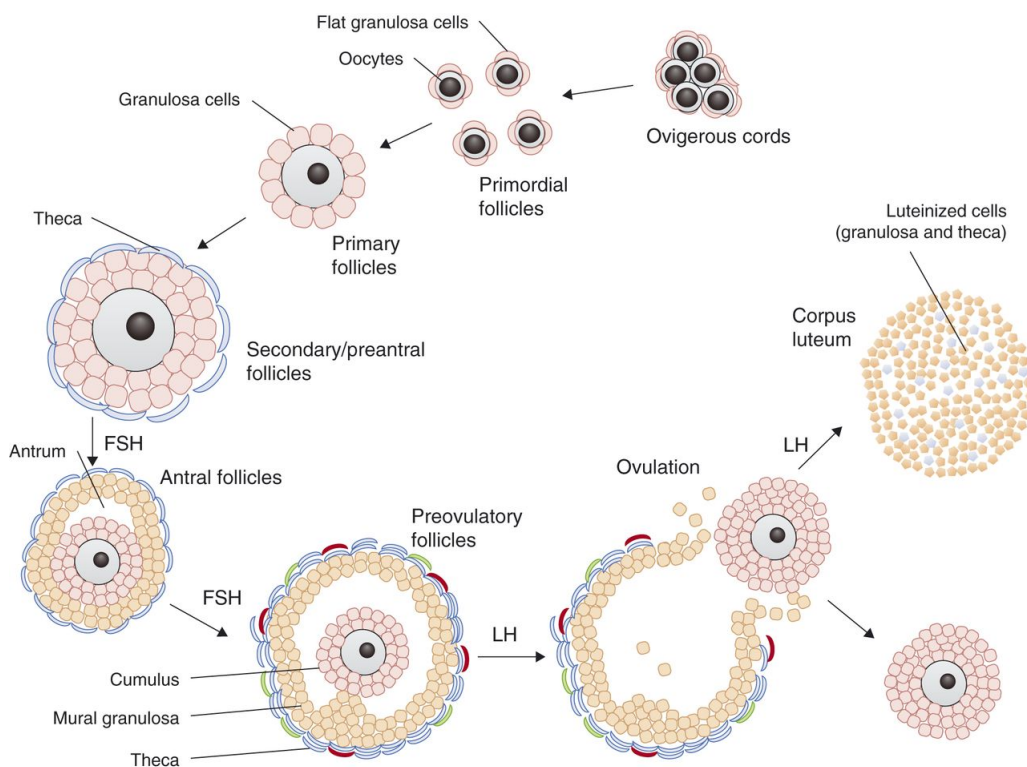


Figure 1 Etapes de la folliculogénèse. La folliculogénèse débute avec les follicules primordiaux qui sont recrutés pour devenir des follicules primaires. Les cellules de la granulosa prolifèrent et forment plusieurs couches autour de l'ovocyte (follicules secondaires ou pré-antraux). A partir de ce stade, une couche de cellules de la thèque entoure les follicules qui commencent à produire des oestrogènes. La croissance folliculaire vers le stade antral dépend des gonadotrophines et, en particulier, de la FSH. Les cellules de la granulosa continuent à proliférer et une cavité liquidienne, l'antra, sépare les cellules de la granulosa en cellules murales et du cumulus oophorus. A ce stade, la sélection folliculaire a lieu et un seul follicule poursuit sa croissance jusqu'au stade pré-ovulatoire, alors que les autres s'atréfient. Après l'ovulation qui

est déclenchée par le pic de LH, les cellules de la granulosa et de la thèque se lutéinisent et forment le corps jaune, qui produit principalement de la progestérone. Adapté de *Georges et al* [4].

Le cycle menstruel correspond à l'intervalle entre 2 périodes de menstruations et s'étale sur 26 à 34 jours, avec une durée moyenne de 28 jours. Il est constitué de 2 phases : la phase folliculaire d'une durée variable entre 12 et 20 jours, puis la phase lutéale d'une durée constante de 14 jours. Ces 2 phases sont séparées par l'ovulation, qui survient 14 jours avant les menstruations, c'est-à-dire au 14^{ème} jour d'un cycle régulier de 28 jours.

La succession régulière des cycles menstruels dépend d'une coopération entre les différents éléments de l'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien. Des neurones hypothalamiques spécialisés sécrètent l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) de façon pulsatile au niveau du système porte hypothalamo-hypophysaire, ce qui permet à la GnRH d'arriver sans dilution au contact des cellules gonadotropes de l'hypophyse. Celles-ci sécrètent 2 gonadotrophines, la FSH et la LH, en réponse à l'action de la GnRH. La sécrétion de ces gonadotrophines est stimulée par l'action pulsatile de la GnRH, mais inhibée par une action continue de la GnRH au niveau de ses récepteurs. Ce phénomène de désensibilisation est lié à une internalisation des récepteurs et est largement utilisé dans les hyperstimulations ovariennes contrôlées (COH) en procréation médicalement assistée (PMA) pour bloquer l'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien et empêcher une ovulation prématurée. Enfin, les gonadotrophines se fixent sur leurs récepteurs au niveau des cellules de la granulosa pour la FSH, et des cellules de la thèque interne et de la granulosa en fin de phase folliculaire pour la LH. Les cellules de la granulosa et de la thèque interne sont responsables de la production des hormones stéroïdiennes ovariennes (oestrogènes, progestérone et androgènes). Cette stéroïdogénèse nécessite une coopération entre les cellules de la thèque qui possèdent l'arsenal enzymatique nécessaire à la synthèse de la progestérone et des androgènes, et les cellules de la granulosa capables de produire la progestérone et les oestrogènes par aromatisation des androgènes produits par la thèque. On parle de « théorie bicellulaire » de la stéroïdogénèse ovarienne. Les follicules ovariens synthétisent également les inhibines qui sont des glycoprotéines : l'inhibine B est principalement sécrétée par les cellules de la granulosa en phase folliculaire sous l'effet de la FSH, alors que l'inhibine A est majoritairement synthétisée par le corps jaune en phase lutéale. Les hormones stéroïdiennes et les inhibines exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, qui inhibe la synthèse des gonadotrophines. Les inhibines exercent plus spécifiquement un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de FSH (Figure 2).

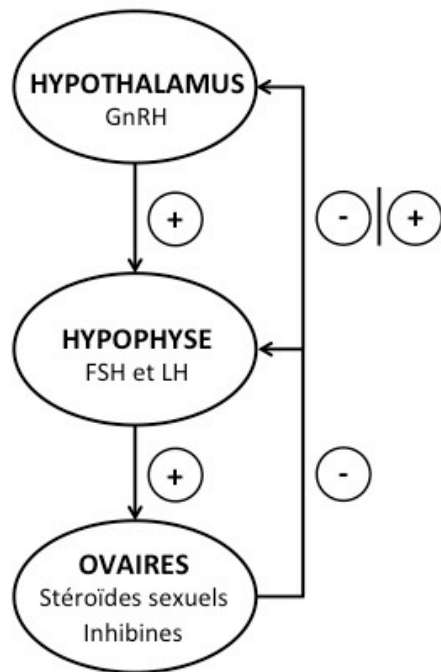


Figure 2 Axe hypothalamo-hypophysio-ovarien. L'hypothalamus sécrète la GnRH qui stimule la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires, FSH et LH. La FSH et la LH stimulent la sécrétion des stéroïdes sexuels et des inhibines au niveau ovarien. Les stéroïdes sexuels et les inhibines exercent à leur tour un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de la GnRH et des gonadotrophines hypophysaires. Par contre, des taux élevés d'oestradiol augmentent la pulsativité de sécrétion de la GnRH et sont responsables d'un pic de LH, et d'un pic moindre de FSH, à mi-cycle.

Au début de la phase folliculaire, une cohorte d'une dizaine de follicules antraux est recrutée au niveau de chaque ovaire, lorsque la réserve ovarienne est normale. La phase folliculaire débute par une élévation de la FSH, liée à une chute des taux d'oestradiol et d'inhibine A suite à la régression du corps jaune du cycle précédent. La chute de ces hormones permet la levée du rétrocontrôle négatif exercé sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, et donc une augmentation transitoire de la FSH. Celle-ci stimule, d'une part, la croissance des follicules antraux et, d'autre part, la synthèse d'oestradiol et d'inhibine B, ainsi que l'acquisition de récepteurs à la LH au niveau des cellules de la granulosa. Chaque follicule antral a une sensibilité différente à la FSH, ce qui permet la sélection du follicule dominant. Celui-ci atteint une taille d'environ 10 mm au 8^{ème} jour du cycle par multiplication des cellules de la granulosa et par synthèse de FF. En effet, l'oestradiol et l'inhibine B synthétisés par l'ensemble des follicules en croissance exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire avec une baisse progressive des taux de FSH dès le 8^{ème} jour du cycle. Le follicule le plus sensible à la FSH, grâce à un nombre plus élevé de récepteurs, est sélectionné et poursuit son développement, alors que les autres follicules, insuffisamment stimulés, entrent en atrophie. La maturation de l'ovocyte primaire se poursuit avec une synthèse de protéines et d'ARN, qui seront indispensables à la fécondation et aux premières étapes du développement embryonnaire. Le follicule dominant poursuit sa croissance jusqu'au stade pré-ovulatoire (environ 20 mm de diamètre) et sécrète des taux croissants d'oestradiol qui augmentent la pulsativité de la sécrétion de la GnRH par les cellules

hypothalamiques, ce qui déclenche le pic de LH vers le 14^{ème} jour du cycle, et un pic moindre de FSH. Ce pic de LH dure environ 24h chez la femme (Figure 3).

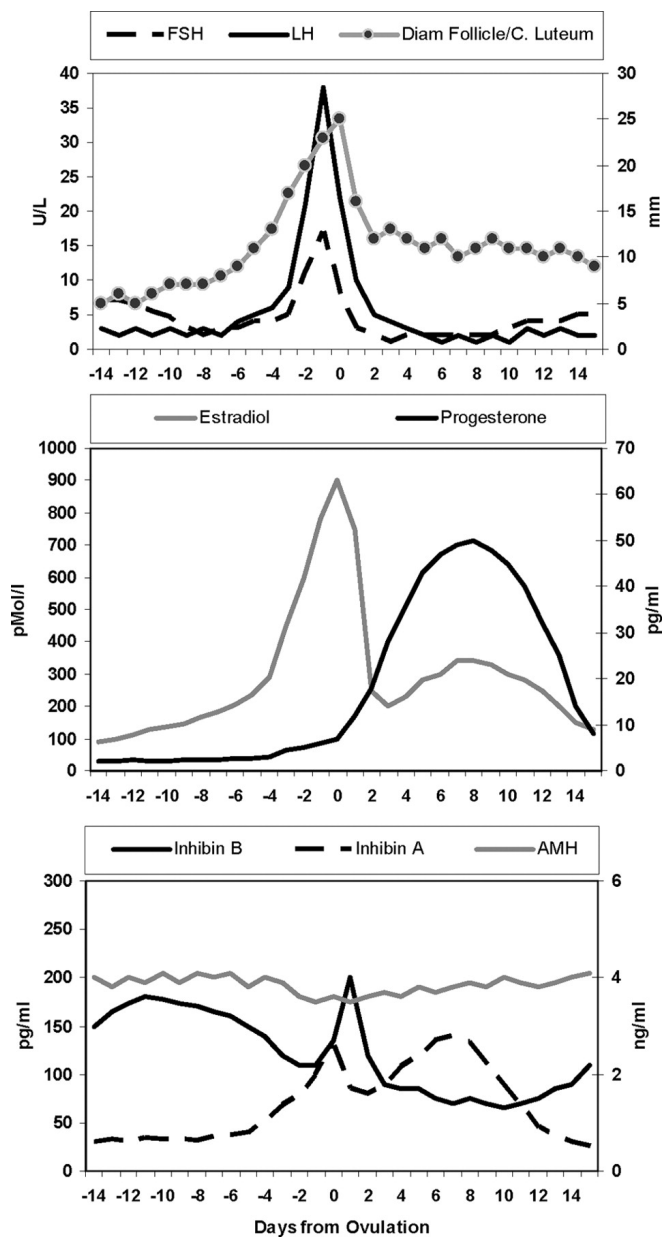


Figure 3 Variations hormonales et croissance folliculaire au cours du cycle menstruel. Adapté de Broekmans et al [5].

Dans les 36 heures qui suivent le pic de LH, la méiose ovocytaire reprend jusqu'au stade de la 2^{ème} métaphase avec formation d'un ovocyte secondaire haploïde et émission du premier globule polaire. De plus, le complexe cumulo-ovocytaire (COC), formé des cellules du cumulus oophorus et de l'ovocyte, subit un phénomène d'expansion et se détache des cellules de la granulosa murales pour flotter dans le liquide folliculaire. Cela permettra de récupérer ce COC par aspiration du FF lors de la ponction ovarienne en vue d'une fécondation *in vitro* (FIV). Enfin, la lame basale qui sépare la granulosa de la thèque se rompt, ce qui permet aux cellules de la thèque et aux vaisseaux sanguins de pénétrer la couche de cellules de la granulosa, étape

indispensable à la lutéinisation du follicule (Figure 4). Après ces premières 36 heures, la paroi du follicule et l'épithélium de surface ovarien se rompent, ce qui libère le COC (Voir §1.2.2.). Celui-ci est capté par les franges de la trompe utérine, puis migre vers son ampoule où il pourra être fécondé. L'ovocyte survit 24h en l'absence de fécondation par un spermatozoïde. L'ovulation s'accompagne d'une chute transitoire du taux d'oestradiol sanguin.

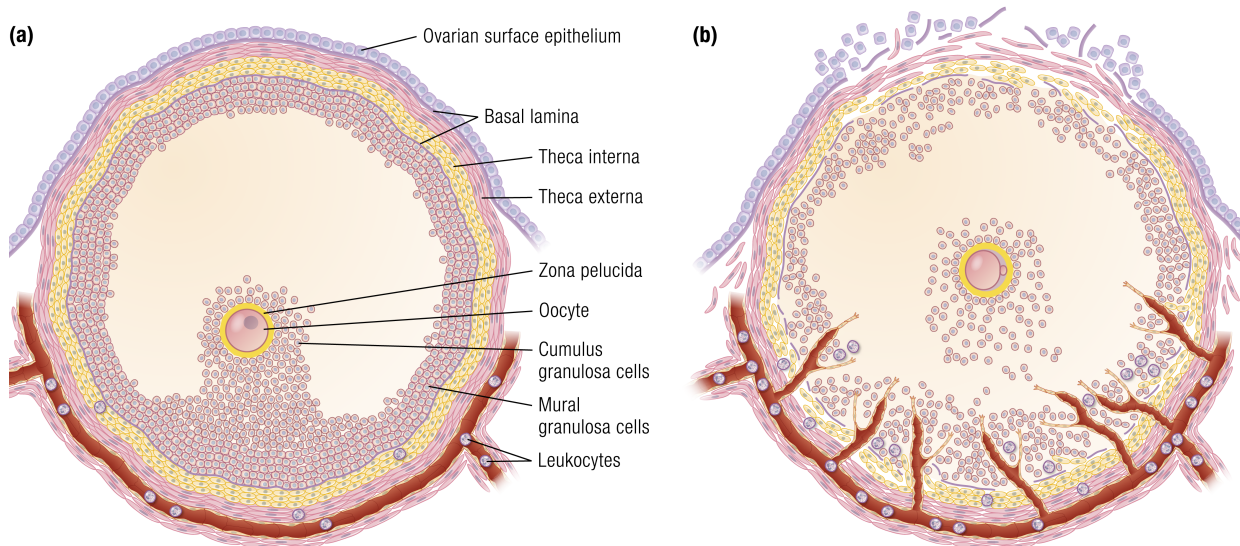


Figure 4 Follicule préovulatoire avant (a) et après (b) le pic de LH. (a) L'ovocyte est entouré du cumulus, qui le relie aux cellules de la granulosa murales. La granulosa avasculaire est séparée de la thèque richement vascularisée par une membrane basale. Des leucocytes résidents sont présents au niveau de la thèque. (b) Après le pic de LH mais avant l'ovulation, la lame basale qui sépare la granulosa de la thèque se rompt. Les cellules de la thèque, les vaisseaux sanguins et les leucocytes peuvent ainsi pénétrer la couche de cellules de la granulosa. Le complexe cumulo-ovocyttaire se détache des cellules de la granulosa murales. Au niveau de l'apex du follicule se produit une perte de cellules de la granulosa, de la thèque et de l'épithélium de surface ovarien, ainsi qu'une rupture des membranes basales, permettant l'ovulation. Adapté de *Duffy et al* [6].

La phase lutéale débute après l'ovulation. Elle est caractérisée par la lutéinisation des cellules de la granulosa sous l'effet de la LH et par la transformation du follicule rompu en corps jaune. Celui-ci synthétise principalement de la progestérone, mais aussi de l'oestradiol, des androgènes et de l'inhibine A. En effet, le pic de LH diminue la synthèse des androgènes et stimule la synthèse de progestérone au niveau de la thèque, par modification de l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse. De la même manière, le pic de LH entraîne une diminution de la production d'oestrogènes et initie la sécrétion de progestérone, avant l'ovulation, au niveau des cellules de la granulosa. Un réseau vasculaire important se développe autour des cellules de la granulosa lutéinisées [6]. Ce corps jaune a une durée de vie de 14 jours, puis il entre en apoptose en l'absence de fécondation et de formation d'un embryon. On parle de lutéolyse avec chute des taux d'oestradiol et d'inhibine A, qui permettront l'initiation du cycle suivant par élévation de la FSH (Figure 3).

Les modifications hormonales au cours du cycle menstruel sont responsables de modifications endométriales. Lors de la phase folliculaire, l'oestradiol entraîne un épaissement progressif de l'endomètre (phase proliférative). En phase lutéale, la

progestérone inhibe la prolifération de l'endomètre et entraîne des modifications histologiques qui le rendent réceptif à l'implantation éventuelle d'un embryon (phase sécrétoire). En fin de phase lutéale, la chute du taux de progestérone est responsable de la desquamation de l'endomètre déclenchant les menstruations [1-3].

1.2. Ovulation et inflammation

1.2.1. Hypothèse d'Espey

En 1980, Espey a proposé l'hypothèse selon laquelle l'ovulation était comparable à une réaction inflammatoire [7]. Le pic de gonadotrophines induirait au niveau des follicules matures un état inflammatoire, qui conduirait à la rupture de la surface ovarienne permettant l'expulsion de l'ovocyte dans la cavité pelvienne.

Premièrement, le pic de LH induit une augmentation du flux sanguin ovarien, une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire, de sorte que le follicule pré-ovulatoire devient oedématié. Ces modifications vasculaires sont comparables à celles qui ont lieu au niveau d'un tissu enflammé.

Deuxièmement, avant l'ovulation, une accumulation de leucocytes a lieu au niveau des vaisseaux sanguins qui entourent les follicules de grande taille. Comme dans une réaction inflammatoire, ces leucocytes produisent des médiateurs de l'inflammation et libèrent des enzymes protéolytiques.

Un processus inflammatoire se caractérise également par la prolifération des fibroblastes. Ceux-ci sont abondants au niveau de la thèque du follicule et prennent l'apparence des cellules en prolifération dès avant l'ovulation, puis migrent au niveau de la granulosa au moment de la formation du corps jaune.

Enfin, le pic de gonadotrophines induit une augmentation de la synthèse de prostaglandines et de l'activité des enzymes protéolytiques au niveau des follicules matures. Dans les processus inflammatoires, les prostaglandines et les enzymes protéolytiques sont impliquées dans les modifications vasculaires et le remodelage du tissu conjonctif.

1.2.2. Mécanisme de l'ovulation

L'ovulation nécessite la rupture de l'apex du follicule et de l'épithélium de surface ovarien, permettant la libération du COC au niveau de la cavité pelvienne. Ce phénomène dépend de l'action de prostaglandines, de facteurs de croissance vasculaires, de cytokines, de chémokines et de leurs récepteurs, ainsi que de protéases et leurs inhibiteurs, dont la production par les cellules de la granulosa et de la thèque est induite par le pic de LH [6] (Table 1).

Ces médiateurs entraînent une augmentation du flux sanguin ovarien et des modifications vasculaires régionales avec vasodilatation, augmentation de perméabilité vasculaire et angiogenèse au niveau du follicule pré-ovulatoire, sauf au niveau de son apex où le flux sanguin diminue. Ces médiateurs sont également responsables de remaniements localisés de la matrice extracellulaire avec une protéolyse accrue au

niveau de l'apex. Cette protéolyse ciblée et la baisse localisée de la vascularisation favorisent la rupture du follicule au niveau de l'apex [6].

Table 1 Résumé des changements induits par le pic de LH au niveau du follicule. Adapté de *Duffy et al* [6].

	Avant le pic de LH	12-24h après le pic de LH	36h après le pic de LH
Cumulus	<ul style="list-style-type: none"> Cumulus compact 	<ul style="list-style-type: none"> Début de l'expansion du cumulus 	<ul style="list-style-type: none"> Fin de l'expansion du cumulus qui se détache des cellules de la granulosa
Ovocyte	<ul style="list-style-type: none"> Vésicule germinale intacte 	<ul style="list-style-type: none"> Méiose 1 	<ul style="list-style-type: none"> Méiose 2
Granulosa	<ul style="list-style-type: none"> Prolifération importante Synthèse d'oestrogènes prédominante 	<ul style="list-style-type: none"> Arrêt de la prolifération et hypertrophie cellulaire Synthèse de progestérone prédominante Sécrétion de cytokines, chémokines, protéases+inhibiteurs,... Affaiblissement de la membrane basale 	<ul style="list-style-type: none"> Hypertrophie cellulaire Synthèse de progestérone prédominante Sécrétion de prostaglandines Perte cellulaire au niveau de l'apex du follicule
Thèque interne	<ul style="list-style-type: none"> Synthèse d'androgènes prédominante 	<ul style="list-style-type: none"> Sécrétion de progestérone et d'androgènes Sécrétion de protéases+inhibiteurs 	<ul style="list-style-type: none"> Invasion focale de la granulosa Perte cellulaire au niveau de l'apex du follicule
Vascularisation	<ul style="list-style-type: none"> Vaisseaux de petit calibre au niveau de la thèque interne et de grand calibre au niveau de la thèque externe 	<ul style="list-style-type: none"> Vasodilatation au niveau de la thèque Angiogenèse au niveau de la thèque interne et de la granulosa 	<ul style="list-style-type: none"> Angiogenèse au niveau de la granulosa Augmentation du flux sanguin au niveau de la base et diminution du flux sanguin au niveau de l'apex du follicule
Leucocytes	<ul style="list-style-type: none"> Cellules immunitaires résidentes 	<ul style="list-style-type: none"> Infiltration du stroma, de la thèque puis de la granulosa Sécrétion de cytokines, chémokines et protéases 	<ul style="list-style-type: none"> Sécrétion de protéases
Thèque externe et stroma ovarien			<ul style="list-style-type: none"> Protéolyse et perte cellulaire au niveau de l'apex du follicule Contraction des fibres musculaires lisses autour du follicule

1.2.3. Distribution spatio-temporelle des leucocytes au sein de l'ovaire humain

Chez la femme, les leucocytes ovariens sont principalement localisés au niveau du stroma ovarien en périphérie des follicules et au niveau du corps jaune [6].

En phase folliculaire, des macrophages, des neutrophiles et des lymphocytes T sont présents au niveau de la paroi des follicules ovariens, surtout au niveau de la thèque [8-12]. De plus, des macrophages et des lymphocytes T helper ont été mis en évidence au niveau du cumulus oophorus [13]. Brannström a mis en évidence une augmentation marquée du nombre de macrophages et de neutrophiles au niveau des follicules pré-ovulatoires [8]. En phase lutéale, les leucocytes peuvent constituer 20 à 52% de la population cellulaire du corps jaune et sont plus nombreux en phase lutéale précoce et tardive [11, 14]. Une augmentation de la densité des macrophages et des lymphocytes T a également été démontrée dans les corps jaunes en régression,

suggérant un rôle de ces cellules dans la lutéolyse [8-11, 15, 16]. Par contre, les lymphocytes B et les cellules NK sont rares au niveau des fragments ovariens [8, 9, 11].

Les FF obtenus lors de la ponction ovocytaire en FIV contiennent également des leucocytes. Ceux-ci peuvent provenir des lésions vasculaires lors de la ponction et donc du sang périphérique. Cependant, plusieurs équipes ont comparé la composition en leucocytes du FF par rapport au sang des patientes au moment de la ponction ovarienne. Leurs résultats suggèrent qu'il existe des leucocytes résidents au niveau du FF, comme les macrophages et les lymphocytes [17-22].

1.2.4. Implication des leucocytes dans la physiologie ovarienne

Le rôle des leucocytes comme facilitateurs de l'ovulation est de plus en plus décrit dans la littérature [6, 23-25]. Avant le pic de LH, un nombre limité de leucocytes résidents sont présents au niveau de l'ovaire, alors qu'un afflux de leucocytes provenant du sang périphérique et de la rate a lieu après le pic de LH [23, 26, 27]. Ils infiltrent d'abord le stroma ovarien et la thèque des follicules, puis la granulosa après le pic de LH suite à la rupture de la membrane basale séparant la thèque de la granulosa [6] (Table 1). Cette infiltration de leucocytes est facilitée par les modifications vasculaires qui sont induites au niveau de l'ovaire par le pic de LH (Figure 5).

Chez le rat, le taux d'ovulation est augmenté dans un modèle d'ovaire perfusé après addition de leucocytes [28]. *In vivo*, le taux d'ovulation est diminué après injection d'un anticorps anti-neutrophiles chez le rat [29] et après déplétion des macrophages chez la souris [30]. De plus, chez la souris KO pour le colony stimulating factor-1 (CSF-1) avec une diminution majeure du nombre de macrophages ovariens, la fertilité est diminuée par allongement du cycle et réduction du taux d'ovulation [31].

Les cellules de la granulosa et de la thèque des follicules, ainsi que les leucocytes résidents au niveau de l'ovaire, sécrètent des cytokines et des facteurs chémoattractants pour les leucocytes. Après le pic de LH, la synthèse de nombreuses cytokines est augmentée au niveau de l'ovaire. Ces cytokines sont impliquées dans l'angiogenèse, la production de prostaglandines et de protéases, la stéroïdogénèse,... [6]. De la même manière, la production de nombreuses chémokines est stimulée au niveau de l'ovaire. Ces chémokines pourraient participer au recrutement des leucocytes qui a lieu après le pic de LH [6]. Grâce à leur sécrétion de protéases, les leucocytes sont également impliqués dans le remodelage tissulaire et la dégradation de la paroi du follicule avant l'ovulation et dans la réparation tissulaire après l'ovulation [6]. Ils pourraient également participer à la régulation de la stéroïdogénèse. Les macrophages, les monocytes et les lymphocytes sont capables de stimuler la production de progestérone par les cellules de granulosa humaines lutéinisées en conditions basales ou après stimulation par l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG), qui a une structure voisine de la LH [32, 33]. Cependant, d'autres études ont montré une augmentation de la synthèse de progestérone après déplétion des globules blancs au niveau de cellules du corps jaune obtenues par laparoscopie [14] ou au niveau des cellules de granulosa humaines lutéinisées isolées à partir du FF [34].

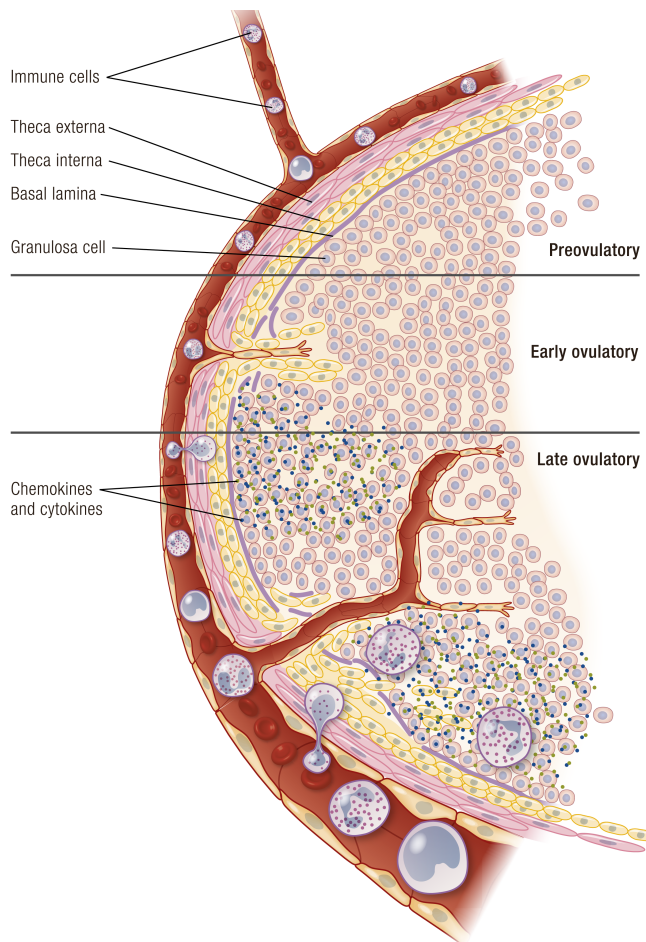


Figure 5 Changements vasculaires et infiltration leucocytaire dans le follicule au moment de l'ovulation. Avant le pic de LH, les leucocytes sont présents au niveau des vaisseaux sanguins et de la thèque du follicule (**haut**). En période ovulatoire précoce, la rupture de la membrane basale qui sépare la thèque de la granulosa fournit des points d'entrée pour la croissance de vaisseaux sanguins à partir de la thèque et permet l'infiltration de leucocytes au niveau de la granulosa (**centre**). En période ovulatoire tardive, la rupture de la membrane basale se poursuit et un réseau vasculaire important se développe. Des leucocytes additionnels sont observés au niveau de la granulosa avant l'ovulation et leur sécrétion de cytokines et de chémokines s'accroît (**bas**). Adapté de *Duffy et al* [6].

Chaque sous-type de leucocyte pourrait participer à différents aspects de la physiologie ovarienne. Les lymphocytes stimuleraient l'infiltration de cellules inflammatoires en sécrétant des cytokines et chémokines, tandis que les neutrophiles seraient impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire nécessaire à la rupture de l'apex du follicule [6]. Les neutrophiles sont activés en période péri-ovulatoire et produisent de plus grandes quantités de superoxyde, de peroxyde d'hydrogène et de monoxyde d'azote [35]. Les macrophages participeraient aux phénomènes d'atresie folliculaire et de lutéolyse, de par leur capacité de phagocytose. Ils seraient impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire nécessaire à l'ovulation et à la lutéolyse, d'une part via la production de protéases, et d'autre part via la sécrétion de chémokines qui permettraient de recruter des monocytes additionnels, mais aussi des lymphocytes et des neutrophiles. Enfin, les macrophages pourraient moduler la croissance folliculaire et la stéroïdogénèse grâce à la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines [6, 36].

1.2.5. Implication des cytokines et chémokines dans la physiologie ovarienne

De nombreuses cytokines et chémokines sont produites en réponse au pic pré-ovulatoire de LH et sont impliquées dans le fonctionnement ovarien [6, 37]. En particulier, les interleukines 1 bêta, 6 et 8 (IL-1 β , IL-6 et IL-8), le tumor necrosis factor (TNF α), le growth-regulated oncogene alpha (GRO α), et le monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) sont produits par les cellules de la granulosa [12, 38-48] et par les leucocytes (monocytes, lymphocytes et neutrophiles activés pour GRO α [49], monocytes et lymphocytes pour MCP-1 et IL-6 [25, 50-53] et monocytes pour IL-1 [54], TNF α [55] et IL-8 [45, 56]). Ces cytokines et chémokines sont toutes détectables dans le FF et les concentrations de GRO α , MCP-1, IL-6 et IL-8 sont plus élevées dans le FF que dans le sang, suggérant une production locale [38-43, 55, 57-59]. Les taux de MCP-1 et d'IL-6 sont plus élevés dans les FF qui contiennent des ovocytes matures, c'est-à-dire en métaphase de la 2^{ème} division méiotique [60, 61]. GRO α et IL-8 sont des facteurs chémoattractants pour les neutrophiles [62], tandis que MCP-1 est un chémoattractant majeur pour les monocytes/macrophages [51, 63] et serait impliqué dans la folliculogénèse, l'ovulation et la lutéolyse [16, 41, 60, 64, 65]. IL-8 a également des propriétés angiogéniques [66]. IL-6 serait impliqué dans l'angiogénèse folliculaire [67], la perméabilité vasculaire [68], la stéroïdogénèse ovarienne [40, 58] et la formation du corps jaune [69]. IL-1 β et TNF α stimulent l'ovulation dans le modèle d'ovaire de rat perfusé [70, 71], ainsi que la production de prostaglandines par les cellules de granulosa [55, 72]. TNF α peut également induire l'apoptose des cellules de granulosa et inhiber la stéroïdogénèse [73], alors qu'IL-1 β pourrait au contraire la stimuler [74].

En résumé, ces cytokines et chémokines pourraient contribuer au recrutement des leucocytes au niveau des follicules avant l'ovulation, ainsi qu'aux modifications du réseau vasculaire et de la stéroïdogénèse qui précèdent l'ovulation. Il a d'ailleurs été démontré que le FF, contenant ces cytokines et chémokines, exerce une activité chémotactique sur les leucocytes, surtout en cas de grossesse [75, 76], et peut stimuler l'angiogénèse [77].

1.3. Fécondation et embryogenèse précoce

La fécondation se produit au niveau de la trompe utérine si un spermatozoïde rencontre l'ovocyte dans les 24h qui suivent l'ovulation. Quand un spermatozoïde franchit le cumulus oophorus et arrive au contact de la zone pellucide autour de l'ovocyte, il s'unit à une glycoprotéine réceptrice de cette zone (ZP3). Cela déclenche la libération d'enzymes contenues au niveau de l'acrosome qui recouvre la tête du spermatozoïde. Ces enzymes permettent au spermatozoïde de traverser la zone pellucide et de fusionner avec la membrane de l'ovocyte, ce qui entraîne deux phénomènes : d'une part, la libération par l'ovocyte de granules corticaux (réaction corticale) qui réagissent avec la zone pellucide et empêchent la pénétration d'autres spermatozoïdes, garantissant ainsi la monospermie ; d'autre part, la reprise de la méiose au niveau de l'ovocyte secondaire avec émission du second globule polaire. L'ovocyte fécondé, appelé zygote, est ainsi diploïde, puisqu'il contient les pronucléi mâle et femelle qui possèdent chacun un chromosome de chaque paire [1, 3].

Dans les 3 premiers jours après la fécondation, une série de divisions mitotiques sans croissance cellulaire entraînent une division du zygote en 2, 4 puis 8 cellules. L'embryon n'augmente pas de volume, car il reste contenu dans la zone pellucide inextensible. C'est au stade de 8 cellules que se produit l'activation du génome embryonnaire ; l'embryon commence à synthétiser ses propres ARN et protéines, alors qu'au préalable, il dépendait exclusivement des ARN et des protéines d'origine maternelle contenus dans l'ovocyte. L'embryon atteint la cavité utérine entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour. Au 4^{ème} jour, il se compose de 16 à 32 cellules et est appelé morula. Au 5^{ème} jour, la morula se transforme en blastocyste (Voir §3.1.1.). Au 6^{ème} jour, le blastocyste sort de la zone pellucide : c'est l'éclosion et il peut alors s'implanter au niveau de l'endomètre (Figure 6).

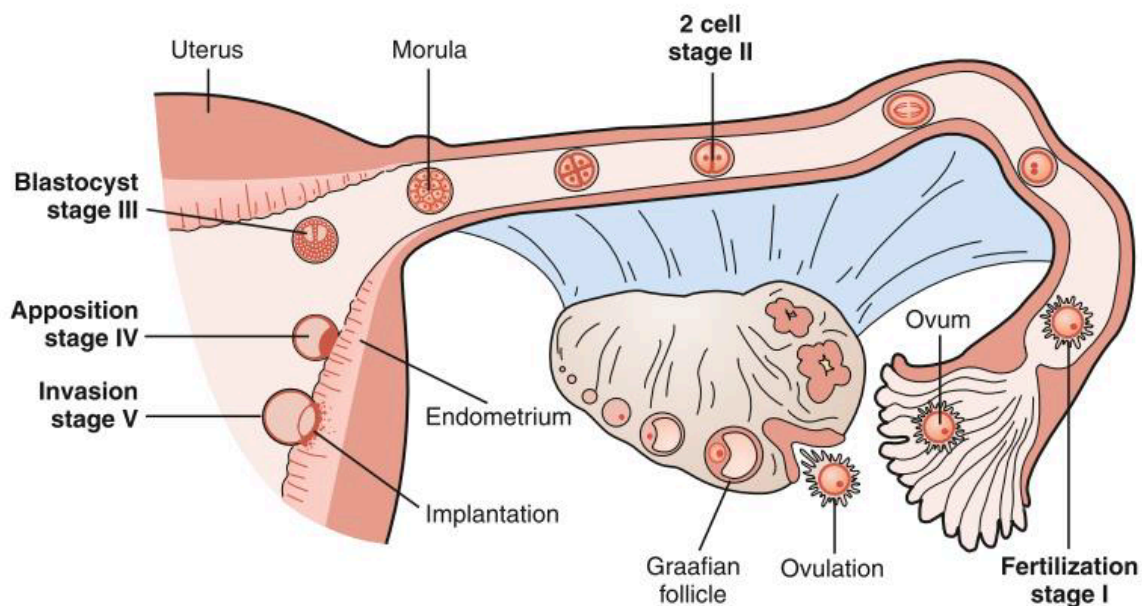


Figure 6 Embryogenèse précoce. La fécondation a lieu au niveau de la trompe utérine dans les 24h qui suivent l'ovulation. Les 3 premières divisions du zygote ont lieu au niveau de la trompe utérine et donnent un embryon de 8 cellules au 3^{ème} jour. Au 4^{ème} jour, l'embryon, appelé morula, est formé de 16 à 32 cellules et atteint la cavité utérine. Au 5^{ème} jour, la morula devient le blastocyste formé d'une masse cellulaire interne, le pôle embryonnaire, entourée du trophoblaste qui donnera le placenta et les annexes foetales. Le blastocyste s'implante au niveau de l'endomètre vers le 6^{ème} jour. Figure extraite du livre *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology*, 2019 [78].

1.4. Implantation

L'implantation de l'embryon humain comporte 3 étapes [79] (Figure 6) :

- l'*apposition* où le blastocyste éclos s'accole à l'endomètre au niveau du trophoblaste qui recouvre le pôle embryonnaire (implantation orientée) ;
- l'*adhésion* où l'embryon s'attache à l'endomètre via des molécules d'adhésion ;
- l'*invasion* où l'embryon pénètre dans la profondeur de l'endomètre.

Dans l'espèce humaine, 2/3 des conceptions échouent avant la fin du premier trimestre suite à un échec d'implantation ou à une fausse couche précoce. L'implantation représente donc une étape clé pour l'établissement d'une grossesse, puisque plus de la

moitié des conceptions échouent à ce stade [80]. Le succès de l'implantation dépend de l'interaction entre le blastocyste et l'endomètre. Un défaut de qualité embryonnaire serait responsable d'1/3 des échecs d'implantation, alors que les anomalies de la réceptivité endométriale et du dialogue entre l'embryon et l'endomètre seraient impliquées dans 2/3 des cas [80]. La réceptivité permet à l'endomètre de fournir un environnement optimal pour le développement de l'embryon et la formation du placenta. L'endomètre n'est réceptif à l'embryon que pendant une période limitée du cycle menstruel, appelée fenêtre d'implantation. Celle-ci dure 4 jours dans l'espèce humaine et survient entre le 20^{ème} et le 24^{ème} jour d'un cycle de 28 jours (ou entre le 7^{ème} et le 11^{ème} jour après le pic de LH). Le succès de l'implantation dépend donc d'une synchronisation entre l'embryon et l'endomètre [81].

L'acquisition de la réceptivité s'accompagne d'une transformation des cellules endométriales qui leur permet de devenir adhérentes pour l'embryon ; un remodelage du cytosquelette des cellules endométriales a lieu et les microvillosités de la membrane plasmique apicale sont remplacées par des projections appelées pinopodes [81].

Un dialogue continu s'établit entre l'embryon et l'endomètre suite à une expression coordonnée de molécules d'adhésion (intégrines, mucines, cadhérines, sélectines,...), de prostaglandines, de facteurs de croissance (heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF),...), de métalloprotéinases (MMP-2 et -9) et de leur inhibiteurs, de cytokines (leukemia inhibitory factor (LIF), IL-11, IL-6, GM-CSF,...) [81, 83]. Le LIF est une cytokine clé pour l'implantation [81] ; elle participe à la régulation des populations de cellules immunitaires déciduals, à l'interaction entre ces cellules immunitaires et le blastocyste et à la formation des pinopodes [81]. Les souris KO pour le LIF sont fertiles, mais leurs blastocystes sont incapables de s'implanter dans l'endomètre. Par contre, ces blastocystes peuvent s'implanter chez une souris receveuse sauvage ou après perfusion intrapéritonéale de LIF chez les souris KO [84]. Dans l'ensemble, l'expression de toutes ces molécules contribue à l'adhésion de l'embryon, à la décidualisation de l'endomètre, à la néo-angiogenèse, au remodelage vasculaire utérin, à la modulation du système immunitaire et au remodelage de la matrice extracellulaire nécessaire à l'invasion du trophoblaste [81, 83, 85]. L'expression d'une partie de ces molécules est hormono-dépendante ; les oestrogènes et la progestérone sont indispensables à l'acquisition de la réceptivité endométriale [83, 86].

Dès avant l'implantation, les cellules du trophoblaste produisent le hCG, qui a une structure voisine de la LH ; il inhibe la lutéolyse et stimule la production de progestérone par le corps jaune, qui est nécessaire au maintien de la grossesse jusqu'à ce que le placenta prenne le relais des sécrétions hormonales vers la 12^{ème} semaine [82]. La progestérone permet la décidualisation de l'endomètre qui est indispensable à l'implantation : l'épithélium s'amincit ; les cellules stromales deviennent polygonales et se chargent de glycogène ; la vascularisation est majorée par néo-angiogenèse à partir des artères utérines et les sécrétions des glandes endométriales augmentent. A côté de son action sur le corps jaune, des travaux menés à l'Université de Liège ont montré que le hCG stimule la production du LIF par l'endomètre [87] et participe à l'angiogenèse utérine, par une double action directe sur les cellules endothéliales et indirecte en stimulant la production de VEGF par les cellules endométriales [88] ; il contribue également à la maturation vasculaire en recrutant les cellules périvasculaires [89]. De

plus, le hCG est impliqué dans la régulation de l'invasion trophoblastique via le système des métalloprotéinases et dans l'immunotolérance maternelle (Voir §1.5.) [82, 90].

Les cellules immunitaires endométriales sont également indispensables à l'implantation et au maintien de la grossesse. Les cellules Natural Killer (NK) prédominent lors de la fenêtre d'implantation [91] (Voir §1.5.). Une réaction inflammatoire physiologique se produit suite à l'interaction entre le blastocyste et les cellules immunitaires [81, 83, 85]. Cette inflammation participe à l'angiogenèse et au remodelage tissulaire nécessaires à l'implantation. Un déséquilibre de cette réaction inflammatoire, qui devient alors excessive ou insuffisante, peut empêcher l'implantation [81, 92].

1.5. Réponse immunologique de l'endomètre au cours de l'implantation et de la grossesse

L'accumulation de cellules immunitaires au niveau de l'endomètre est déjà présente en phase lutéale avant l'implantation [92]. De plus, les cellules trophoblastiques sont capables d'attirer les cellules NK, les macrophages, les cellules dendritiques (DC) et les lymphocytes, au niveau de l'interface foeto-maternelle [93]. Les cellules immunitaires constituent jusqu'à 40% de la population des cellules déciduales.

Les cellules NK représentent environ 70% des cellules immunitaires déciduales [94]. Leur accumulation commence après l'ovulation, augmente au moment de l'implantation, puis se maintient jusqu'à la première moitié de la grossesse avant de diminuer [82, 94]. Ces cellules sont localisées à proximité des cellules trophoblastiques et des vaisseaux sanguins maternels. Les cellules NK utérines (uNK) sont différentes des cellules NK sanguines ; elles ont une activité sécrétoire importante comportant des cytokines, des chémokines et des facteurs angiogéniques et sont peu cytotoxiques [93, 94]. En effet, les cellules trophoblastiques expriment une variante du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (MHC I), qui se lie préférentiellement aux cellules uNK et pourrait inhiber leur cytotoxicité [94]. Les cellules uNK sont impliquées dans la régulation de l'invasion trophoblastique, dans le remodelage vasculaire nécessaire à la placentation et dans la défense contre les infections gravidiques [94]. Elles pourraient aussi moduler la fonction des cellules immunitaires déciduales dans le sens d'une tolérance [91]. Chez les souris déficientes en cellules NK, l'implantation persiste, mais la décidualisation et le remodelage vasculaire utérin sont altérés [95]. Des taux anormaux de cellules uNK ont été associés aux échecs d'implantation répétés en FIV [96].

Les macrophages représentent environ 20% de la population des cellules immunitaires endométriales, et leur nombre augmente au cours du cycle menstruel pour atteindre, en phase sécrétoire, un pic qui persiste jusqu'au 2^{ème} trimestre de la grossesse [93, 97]. Avec les cellules uNK, les macrophages sont responsables de la majorité de la production des cytokines endométriales. Les macrophages déciduaux ont un profil anti-inflammatoire dit M2, par rapport au profil pro-inflammatoire dit M1. Ils produisent des cytokines, des facteurs de croissance, des facteurs angiogéniques, des métalloprotéinases,... qui sont impliqués dans l'implantation, l'invasion trophoblastique, le remodelage vasculaire et tissulaire, l'angiogenèse, la tolérance immunitaire et la protection contre les infections intra-utérines [97].

Les lymphocytes T représentent la troisième population de cellules endométriales (5-10%), avec une prédominance de cellules T CD8 [81, 93]. Les cellules T reconnaissent les antigènes foetaux, mais leur activation est diminuée pendant la grossesse, notamment suite à une moindre stimulation par les cellules DC. De plus, la variante du MHC I exprimée par les cellules trophoblastiques entraîne une reconnaissance préférentielle par les cellules NK, et non par les cellules T [94]. Les cellules T CD8 déciduales sont également moins cytotoxiques [81]. Les cellules T sont particulièrement impliquées dans la tolérance de la semi-allogreffe foétale. En effet, l'embryon s'implante dans l'utérus maternel (d'où le concept de « greffe ») et exprime à la fois les génomes maternel et paternel (d'où le concept de « semi-allogreffe »). Classiquement, une allogreffe devrait être rejetée par le système immunitaire maternel, puisqu'elle est reconnue comme différente du « soi ». Le paradoxe immunologique de la grossesse réside donc dans le non-rejet de cette semi-allogreffe, malgré les contacts étroits entre le fœtus, le placenta et le système immunitaire maternel. Cette tolérance dépend d'un dialogue entre l'embryon et les cellules immunitaires, avec adaptation du système immunitaire maternel [94].

La grossesse est associée à un déplacement de la balance immunitaire adaptative T helper 1 (Th1)/ T helper 2 (Th2) vers la réponse Th2. Il s'agit du paradigme Th1/Th2, selon lequel la grossesse est considérée comme un phénomène Th2 [98]. Les lymphocytes Th1 et Th2 font partie des lymphocytes T CD4 et sécrètent des cytokines Th1 (IL-2 et interféron gamma (INF- γ)) ou Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 et IL-13) capables d'influencer les populations cellulaires présentes au niveau de l'interface foeto-maternelle [81, 85, 99]. Les cellules Th1 génèrent des réponses immunitaires cellulaires et sont considérées comme pro-inflammatoires. A l'inverse, les cellules Th2 sont impliquées dans les réponses immunitaires humorales et sont considérées comme anti-inflammatoires [100]. Ainsi, les cytokines de type Th1 sont capables d'entraîner le rejet de la semi-allogreffe foétale, alors que les cytokines de type Th2 inhibent les réponses Th1 et permettent la tolérance de l'allogreffe foétale [101]. Les cellules DC présentent également un profil de type Th2 pendant la grossesse [102]. Chez la souris, les cytokines de type Th1 ont un effet abortif, alors que les cytokines de type Th2 favorisent le maintien de la grossesse [103]. Chez l'homme, un déplacement de la balance Th1/Th2 en faveur d'un environnement Th1 a été associé aux fausses couches à répétition [101, 104, 105].

Ce paradigme a par la suite été remis en question [106]. En effet, les souris KO pour une ou plusieurs cytokines Th2 sont fertiles [107]. De plus, ce paradigme ne s'applique pas à l'implantation, qui est associée à une réaction inflammatoire physiologique, et à la participation de cytokines de type Th1 [81, 93, 106, 108]. Certaines cytokines de type Th1, comme l'IFN- γ , sont nécessaires au maintien de la grossesse [109]. Enfin, la découverte de nouveaux sous-types de lymphocytes T CD4, T helper 17 (Th17) et T régulateurs (Treg), a conduit à l'établissement d'un nouveau paradigme Th1/Th2/Th17/Treg [85].

Dans ce nouveau paradigme, les cellules Th1 et Th17 sont considérées comme nocives, alors que les cellules Th2 et Treg sont favorables au maintien de la semi-allogreffe foétale.

Les cellules Treg sont identifiées par l'expression du facteur de transcription Foxp3 et sécrètent le transforming growth factor- β (TGF- β) et l'IL-10 [81, 110]. Elles sont

importantes pour l'homéostasie immunitaire. Une augmentation du nombre de cellules Treg a été démontrée au niveau du sang périphérique et de l'utérus chez la femme et la souris pendant la grossesse [111, 112]. Ces cellules exercent des fonctions anti-inflammatoires et immunorégulatrices indispensables à l'implantation et au maintien de la grossesse [92]. En effet, elles inhibent la prolifération, la cytotoxicité et la production de cytokines par les lymphocytes T CD8 ; elles favorisent le développement de cellules DC tolérogènes et de macrophages de type M2 et elles inhibent la cytotoxicité des cellules NK [92]. Elles participent également au remodelage vasculaire utérin [92]. Chez la souris, la déplétion en cellules Treg entraîne une résorption fœtale [111], principalement au moment de l'implantation et au début de la grossesse [113]. La population de cellules Treg déciduales est diminuée chez les femmes souffrant de fausses couches à répétition [114] et l'expression de l'ARNm de Foxp3 est diminuée au niveau de l'endomètre de certaines femmes infertiles [115]. Des cellules Treg mémoires persistent lors d'une grossesse ultérieure [92].

Les cellules Th17 sont pro-inflammatoires, sécrètent notamment l'IL-17 et sont impliquées dans la défense immunitaire contre les micro-organismes, mais aussi dans les pathologies auto-immunes [85]. Le développement des cellules Th17 et Treg dépend d'un précurseur commun exposé au TGF- β , qui est notamment sécrété par le trophoblaste. Cependant, la différenciation est orientée vers les cellules Th17 en présence d'IL-6 [81]. Une augmentation du nombre de cellules Th17 associée à une inversion du rapport entre les cellules Th17 et Treg a été mise en évidence au niveau du sang périphérique et de la déciduale de patientes souffrant de fausses couches à répétition [116, 117]. Chez ces dernières, cette inversion du rapport entre les cellules Th17 et Treg au niveau du sang périphérique a également été démontrée en phase lutéale [117]. Des taux sériques augmentés d'IL-17 ont également été retrouvés chez des patientes souffrant d'infertilité inexplicée [99].

En résumé, le maintien de la grossesse dépend donc d'un déplacement de la balance Th1/Th2 vers la réponse Th2 et de la balance Th17/Treg vers la réponse Treg. La progestérone et l'oestradiol stimulent les réponses Th2 et Treg et inhibent la réponse Th1 pendant la grossesse. La progestérone inhibe également la réponse Th17 [99]. Le hCG produit par le trophoblaste participe à la modification de la balance immunitaire Th1/Th2, à la prolifération des cellules uNK et au recrutement périphérique et utérin des cellules Treg [82]. Un déséquilibre vers les immunités Th1 et Th17 pourrait être impliqué dans les échecs d'implantation et les fausses couches à répétition [81].

Les cellules DC sont peu nombreuses [97] et sont retenues au niveau de la déciduale maternelle, ce qui diminue leur capacité d'activer les cellules T en présence des antigènes foetaux [81]. Le hCG diminue également la capacité des cellules DC à stimuler la prolifération des cellules T [82]. De plus, la fonction des cellules DC est orientée vers une tolérance immunitaire privilégiant les profils Th2 et Treg [81, 102]. Les lymphocytes B et les granulocytes sont également peu représentés au niveau de la déciduale maternelle [97].

1.6. Evaluation de la réceptivité endométriale en clinique

De nombreux travaux de recherche se sont intéressés à la réceptivité endométriale et ont permis de mieux comprendre les mécanismes associés au dialogue entre l'embryon et l'endomètre au cours de l'implantation. Cependant, cela n'a pas

encore réellement abouti au développement de tests pronostic et de traitements applicables en clinique [80].

De nombreux facteurs peuvent potentiellement altérer la réceptivité endométriale :

- des facteurs utérins comme les polypes, les septums, les fibromes, l'adénomyose ou les adhérences qui peuvent interférer mécaniquement avec l'implantation de l'embryon, altérer la péristaltique utérine, libérer des molécules ayant un impact négatif sur l'implantation et/ou perturber la décidualisation et la vascularisation de l'endomètre [91, 118]
- une augmentation de la contractilité utérine [91]
- un endomètre mince qui pourrait empêcher l'implantation suite à la production en plus grande quantité d'espèces réactives de l'oxygène. En effet, la tension en oxygène est plus élevée au niveau de la couche basale qu'à la surface de l'endomètre [118]
- une anomalie du flux sanguin endométrial ou sous-endométrial
- un déplacement de la fenêtre d'implantation responsable d'un asynchronisme entre l'endomètre et l'embryon [81]
- une dérégulation de l'expression des médiateurs de l'implantation (facteurs de croissance, molécules d'adhésion, cytokines,...), qui pourrait intervenir dans les échecs d'implantation répétés, l'endométriome et les hydrosalpinx [118, 119]
- des taux anormalement élevés d'oestradiol ou une élévation prématurée de la progestérone lors de la stimulation ovarienne en FIV [118, 119]
- le microbiote utérin qui pourrait avoir un impact sur les populations de cellules immunitaires endométriales, la tolérance immunitaire et le remodelage endométrial [93].

Une méta-analyse récente a étudié l'intérêt des marqueurs de réceptivité endométriale évalués par échographie, par aspiration de fluide endométrial, par hystérocopie ou par biopsie endométriale [80]. Les marqueurs évalués par échographie comprennent l'épaisseur endométriale, le volume endométrial, l'aspect de l'endomètre en triple couche, les indices doppler évaluant le flux sanguin endométrial ou sous-endométrial et la contractilité utérine. Différentes protéines et cytokines ont été quantifiées au niveau du fluide endométrial, mais aucun de ces marqueurs n'a été développé en tant que test diagnostique. En hystérocopie, la vascularisation et l'aspect des glandes endométriales ont également été évalués comme marqueurs de réceptivité. Au niveau des biopsies endométriales, la datation histologique selon les critères de Noyes [120], le compte des cellules uNK et la présence de pinopodes ont été proposés. L'épaisseur endométriale est le marqueur le plus utilisé, mais aucune différence significative de ce paramètre n'a été démontrée entre les patientes enceintes ou non. Globalement, la capacité de ces tests à prédire le taux de grossesse clinique en cas de conception spontanée ou médicalement assistée est faible.

De nouveaux tests de réceptivité endométriale ont été récemment développés grâce à l'avènement de la transcriptomique qui a permis d'étudier l'ensemble des ARNm exprimés par l'endomètre à différentes phases du cycle menstruel. Lors de l'acquisition de la réceptivité endométriale, l'expression de différents gènes impliqués notamment dans la réponse immunitaire est modifiée. Cela a permis de développer le test ERA ou « endometrial receptivity analysis », grâce à la technique de microarray, puis plus

récemment de Séquençage de Nouvelle Génération (NGS). L'ARN est extrait à partir d'une biopsie endométriale et l'expression de 248 gènes est évaluée, ce qui permet de classer l'endomètre en 4 catégories : prolifératif, pré-réceptif, réceptif ou post-réceptif. Ce test a permis de mettre en évidence un déplacement de la fenêtre d'implantation chez certaines patientes infertiles. Chez celles-ci, l'endomètre n'est pas réceptif si le transfert d'embryon est réalisé selon les protocoles classiques en FIV (Voir §2.4.4 et 2.4.5.) et l'implantation échoue suite à un asynchronisme entre le blastocyste et l'endomètre. Chez ces patientes, un transfert d'embryon dit personnalisé est proposé lors d'un cycle ultérieur, en fonction des résultats du test ERA. La durée du traitement par progestérone est ainsi allongée ou raccourcie pour programmer le moment idéal du transfert d'embryon personnalisé [81]. Les résultats d'une étude randomisée contrôlée multicentrique évaluant le test ERA sont fortement attendus [80, 119].

2. Infertilité

2.1. Définitions

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit l'infertilité comme « une maladie du système reproducteur avec incapacité d'obtenir une grossesse après ≥ 12 mois de rapports sexuels réguliers non protégés chez un couple en âge de procréer », alors que la stérilité représente un « état permanent d'infertilité » [121]. L'infertilité concerne 8 à 12% des couples dans le monde [122], mais ce chiffre peut monter jusqu'à 30% dans certaines régions (Asie centrale et du Sud, Afrique, Moyen-Orient, Europe centrale et de l'Est,...). Elle peut être primaire si l'individu ou le couple n'a jamais obtenu de grossesse, ou secondaire dans le cas contraire.

La fécondabilité, ou la probabilité pour un couple d'obtenir une grossesse par cycle menstruel, est d'environ 20 à 25% dans l'espèce humaine [123]. Les 3 facteurs principaux qui affectent cette fécondabilité sont [121] :

- la durée de la période d'essai : 80% des couples obtiennent spontanément une grossesse après 6 mois d'essais et 90% après 1 an. Parmi les 10% restants, 5% n'auront pas obtenu de grossesse après 2 ans.
- l'âge de la femme : la fertilité commence à décliner vers 30 ans et l'âge médian de la dernière grossesse est de 41 ans (Figure 7). En Europe, l'âge de la première grossesse avoisine aujourd'hui 30 ans.
- l'infertilité secondaire à une pathologie comme l'hypogonadisme hypogonadotrope, l'hyperprolactinémie, la mucoviscidose, les infections génitales, certaines maladies systémiques, l'insuffisance ovarienne prématurée, le syndrome des ovaires micropolykystiques, l'endométriose, les fibromes et polypes utérins, l'insuffisance testiculaire,...

De nombreux autres facteurs interviennent également, tels que la diminution de la qualité du sperme avec le temps, l'exposition à des perturbateurs endocriniens, la consanguinité,... [121].

2.2. Bilan initial du couple infertile

Dans les pays industrialisés, 15% des couples vont consulter pour une infertilité primaire ou secondaire. Le bilan de base d'un couple hypofécond comporte [124] :

- une anamnèse détaillée des 2 membres du couple :
 - durée de la période d'essai
 - fréquence des rapports sexuels
 - type d'infertilité, primaire ou secondaire
 - âge
 - profession et exposition éventuelle à des toxiques environnementaux
 - consommation de tabac, d'alcool ou de drogues
 - indice de masse corporelle (IMC) : un IMC trop bas ou trop élevé peut entraîner des troubles de l'ovulation et altérer les chances d'implantation.
 - antécédents médico-chirurgicaux et traitements éventuels qui peuvent altérer la fertilité
 - antécédents gynécologiques : dysménorrhée, dyspareunie, infection pelvienne, endométriose, kyste ovarien, conisation,...
 - régularité et durée des cycles menstruels : des cycles courts sont associés à une baisse de la réserve ovarienne, alors que des cycles longs et irréguliers sont associés à des troubles de l'ovulation. Une aménorrhée peut être signe d'anovulation ou d'évolution vers la ménopause.
 - antécédents urologiques : cryptorchidie, varicocèle, troubles de l'érection ou de l'éjaculation, infections génitales,...
 - antécédents familiaux

- un bilan masculin : l'examen principal est le spermogramme qui est analysé selon des critères de normalité définis par l'OMS et revus en 2010, à partir d'une cohorte de 4500 hommes ayant obtenu une grossesse après 1 an d'essai [125]. Les chiffres représentent le 5^{ème} percentile de cette population fertile et l'intervalle de confiance à 95% :
 - volume du sperme : 1,5 ml (1,4 - 1,7)
 - nombre total de spermatozoïdes par éjaculat : 39 millions (33-46)
 - concentration en spermatozoïdes : 15 millions par ml (12-16)
 - vitalité : 58% (55-63)
 - mobilité totale (progressive et non progressive) : 40% (38-42)
 - morphologie normale : 4% (3-4)

On parle d'azoospermie en cas d'absence de spermatozoïdes au niveau de l'éjaculat, d'oligospermie si la concentration en spermatozoïdes est inférieure à 15 millions par ml, d'asthénospermie si la mobilité totale est inférieure à 40% et de tératospermie si le pourcentage de spermatozoïdes de morphologie normale est inférieur à 4%. Une oligo-asthéo-tératospermie correspond à la combinaison de ces 3 anomalies.

- un bilan féminin :
 - biologie réalisée entre le 2^{ème} et le 5^{ème} jour du cycle : FSH, LH, oestradiol (E2), hormone anti-mullérienne (AMH), prolactine, testostérone, bilan thyroïdien

- échographie endovaginale : taille, forme, position de l'utérus et épaisseur de l'endomètre ; compte des follicules antraux de 2 à 10 mm sur chaque ovaire ; recherche de fibrome, polype, malformation utérine, kyste ovarien, hydrosalpinx,...
- évaluation de la perméabilité tubaire par radiographie ou échographie de contraste avec injection intra-utérine d'une solution radio-opaque ou échogène
- évaluation de la cavité utérine par hystérocopie ou échographie de contraste avec injection intra-utérine de solution saline : recherche de polype, de fibrome avec répercussion cavitaire, de septum utérin, d'adhérences,...

Au terme de ce bilan, l'infertilité reste inexpliquée dans environ 25% des cas [124].

Le dosage de la FSH, de l'inhibine B, de l'AMH et le compte folliculaire antral (CFA) ont, entre autres, été proposés pour évaluer la réserve ovarienne [126]. Un marqueur idéal permettrait d'évaluer à la fois la quantité de follicules primordiaux et leur qualité, c'est-à-dire la compétence de l'ovocyte qui en est issu. Cependant, la qualité des follicules primordiaux est très difficile à évaluer, puisque leur développement jusqu'au stade de follicule antral prend plusieurs mois. Le dosage de l'AMH et le CFA seraient les 2 marqueurs les plus sensibles et les plus spécifiques [126]. Ces 2 tests permettent d'évaluer le nombre de follicules antraux recrutables en début de phase folliculaire.

Le nombre de follicules antraux est directement proportionnel à celui des follicules primordiaux. Comme décrit précédemment, le nombre de follicules primordiaux, qui définit la réserve ovarienne, est fixé à la naissance et diminue tout au long de la vie reproductive chez la femme. La chute de la réserve ovarienne s'accélère vers l'âge de 38 ans, mais peut survenir plus précocement chez certaines patientes. L'abaissement de la réserve ovarienne est également associé à une diminution de la qualité ovocytaire avec augmentation du taux d'anomalies chromosomiques (Figure 7).

L'hormone anti-mullérienne (AMH) est une glycoprotéine produite par les cellules de la granulosa à partir du stade de follicule primaire, mais son taux sanguin dépend principalement du nombre de follicules antraux, puisqu'ils contiennent plus de cellules de la granulosa et sont plus vascularisés [5]. Sa quantification dans le sérum permet donc d'évaluer la réserve ovarienne. A la différence de la FSH et de l'oestradiol, le taux d'AMH ne varie pas au cours du cycle et peut donc être quantifié à n'importe quel moment (Figure 3). A la ménopause, le taux d'AMH devient indétectable. L'AMH inhibe le recrutement des follicules primordiaux et diminue la sensibilité des follicules antraux à la FSH.

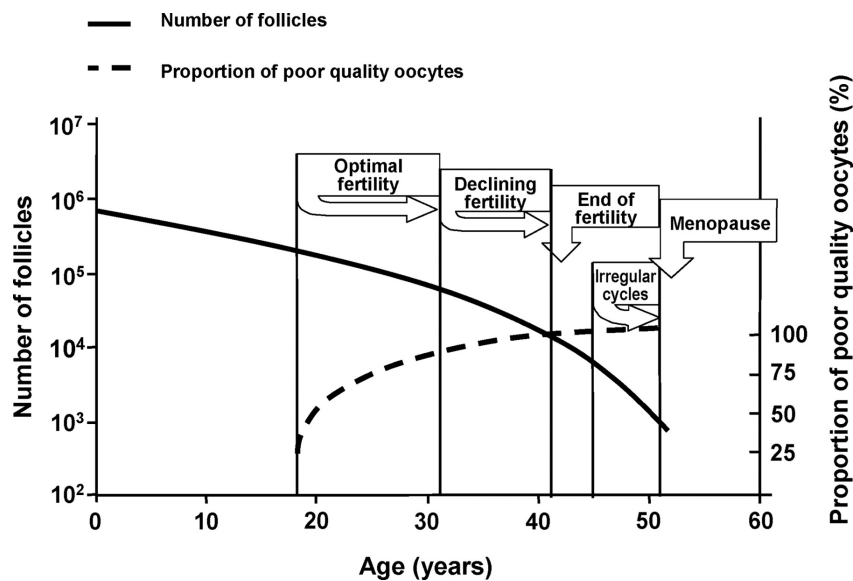


Figure 7 Représentation du nombre de follicules primordiaux et de la qualité ovocytaire en fonction de l'âge. La quantité et la qualité des ovocytes contenus dans les follicules ovariens diminuent avec l'âge. La fertilité diminue progressivement à partir de l'âge de 30 ans en moyenne. La perte de fertilité, qui correspond à l'âge de la dernière grossesse, survient à un âge moyen de 41 ans, avec un intervalle entre 23 et 51 ans. Les cycles se raccourcissent d'abord de 2-3 jours, puis deviennent irréguliers jusqu'à la ménopause qui correspond à l'arrêt définitif des cycles menstruels, quand le pool de follicules primordiaux tombe aux environs de 1000. La ménopause survient à un âge moyen de 51 ans, avec un intervalle entre 40 et 60 ans. Adapté de *Broekmans et al* [5].

2.3. Techniques de procréation médicalement assistée

La procréation médicalement assistée (PMA) comporte 3 techniques principales pour aider les couples infertiles à obtenir une grossesse : le monitoring de l'ovulation, l'insémination intra-utérine (IIU) et la fécondation *in vitro* (FIV). Le choix du traitement dépend des résultats du bilan du couple infertile [124].

Le monitoring de l'ovulation consiste à suivre le développement folliculaire par échographie et biologie chez la femme. En effet, un follicule mûr a une taille minimale de 16 à 18 mm et produit des taux d'oestradiol sérique entre 200 et 300 pg/ml. L'ovulation est déclenchée en présence d'un follicule mûr, ce qui permet de programmer les rapports sexuels. Ce traitement n'est indiqué qu'en cas de perméabilité tubaire et de spermogramme de bonne qualité. Il peut être associé à un traitement de stimulation ovarienne minima, par citrate de clomiphène, létrozole ou gonadotrophines, destiné à obtenir un (ou deux) follicules mûrs chez les patientes présentant des troubles de l'ovulation. Le citrate de clomiphène est un modulateur sélectif des récepteurs aux oestrogènes (SERM), qui agit comme antagoniste au niveau de l'hypothalamus. Le citrate de clomiphène lève le rétrocontrôle négatif des oestrogènes sur la synthèse de la GnRH par l'hypothalamus et augmente la synthèse des gonadotrophines hypophysaires qui stimulent la croissance folliculaire. Le létrozole est un inhibiteur de l'aromatase, qui diminue la conversion des androgènes en oestrogènes, ce qui inhibe également le rétrocontrôle négatif des oestrogènes sur la synthèse de la GnRH.

L'IIU a pour but de faciliter la rencontre des gamètes mâles et femelles au niveau de l'appareil génital féminin en déposant dans la cavité utérine un échantillon de sperme préparé au laboratoire au moment de l'ovulation. La préparation permet de séparer les spermatozoïdes du liquide séminal qui peut être vecteur d'infection et dont les prostaglandines provoquent des contractions utérines, de récupérer les spermatozoïdes mobiles, de les capaciter et de les concentrer dans un faible volume adapté à l'IIU. Les spermatozoïdes sont ainsi déposés au-delà de la barrière cervicale, ce qui facilite leur remontée vers les trompes utérines. Ce traitement n'est possible qu'en cas de perméabilité tubaire et est indiqué dans les troubles de l'éjaculation et les oligo-asthénospermies légères à modérées. L'obtention de moins d'1 million de spermatozoïdes avec une mobilité directionnelle après préparation du sperme est une indication de recours à la FIV. Les IIU sont également possibles en cas d'infertilité inexplicée chez un couple jeune et dans les endométrioses légères à modérées. L'IIU peut être réalisée sans traitement hormonal au cours d'un cycle spontané ou après stimulation ovarienne à minima comme pour le monitoring. L'ovulation est déclenchée par une injection de hCG et l'insémination est réalisée environ 36h plus tard. En effet, l'hCG a une structure voisine de la LH, ce qui lui permet d'interagir avec son récepteur avec une plus grande affinité. Il n'est pas recommandé de prolonger ces traitements au-delà de 6 essais, car le taux de grossesse n'augmente plus significativement après 4 à 6 cycles d'IIU.

La FIV correspond au recueil des gamètes mâles et femelles pour réaliser une fécondation extracorporelle au laboratoire suivie d'un transfert des embryons obtenus au niveau de l'utérus. Ses indications sont les échecs des monitorages ou des IIU, les anomalies sévères du spermogramme et la présence d'anticorps anti-spermatozoïdes au niveau du sperme, l'imperméabilité tubaire bilatérale, l'abaissement de la réserve ovarienne, l'endométriose sévère, la nécessité de réaliser un diagnostic génétique préimplantatoire,...

2.4. Fécondation in vitro

La FIV est une procédure complexe qui comporte plusieurs étapes : l'hyperstimulation ovarienne contrôlée, la ponction ovocytaire et le recueil des spermatozoïdes, la fécondation et la culture embryonnaire puis le transfert d'embryon(s) (Figure 8).

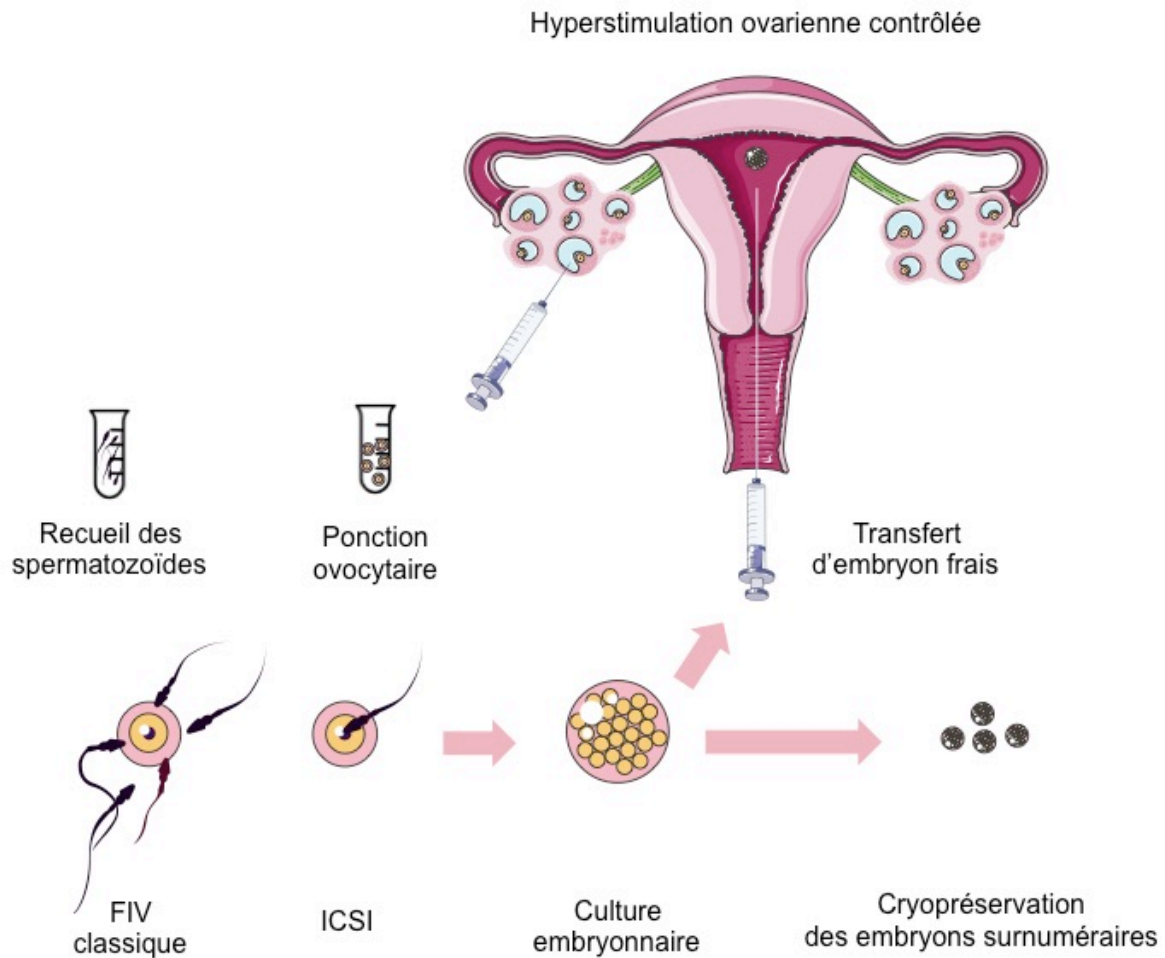


Figure 8 Représentation schématique des étapes de la FIV. Un cycle de FIV commence par une hyperstimulation ovarienne contrôlée chez la femme qui permet d'obtenir une croissance simultanée de plusieurs follicules. Ensuite, la ponction ovocytaire et le recueil des spermatozoïdes sont réalisés le même jour. Deux techniques de fécondation existent en fonction de la qualité du sperme : la fécondation *in vitro* classique (FIV) et l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) en cas d'anomalie du spermogramme. En FIV classique, chaque ovocyte est inséminé dans une concentration donnée de spermatozoïdes, alors qu'en ICSI, un spermatozoïde est sélectionné pour être injecté directement à l'intérieur de chaque ovocyte. Les embryons fécondés sont cultivés au laboratoire pendant 3 à 5 jours. Au terme de cette culture, un (ou plusieurs) embryon(s) sont sélectionné(s) sur base de critères morphologiques pour réaliser un transfert frais, alors que les éventuels embryons surnuméraires de qualité suffisante sont cryopréservés en vue d'une utilisation ultérieure.

2.4.1. Hyperstimulation ovarienne contrôlée

Son objectif est d'obtenir une dizaine d'ovocytes matures par cycle pour augmenter les chances d'obtenir plusieurs embryons de bonne qualité. Cela permettra de cryopréserver les embryons surnuméraires pour les utiliser ultérieurement, si la patiente n'est pas enceinte après le premier transfert d'embryon ou si elle souhaite une deuxième grossesse [124].

La stimulation permet de sauver les follicules non dominants de l'atréxie à l'aide de doses supra-physiologiques de gonadotrophines. Celles-ci étaient initialement isolées

à partir de l'urine de femmes ménopausées, puis des formes recombinantes ont été développées. Les protocoles d'hyperstimulation ovarienne contrôlée (COH) comportent également des injections d'agonistes ou d'antagonistes de la GnRH, dont le but est d'empêcher une ovulation spontanée prématurée qui empêcherait le recueil des ovocytes. Le dosage des gonadotrophines est adapté à la réserve ovarienne de la patiente et sera plus élevé en cas d'abaissement de cette dernière. Il existe plusieurs protocoles de COH [124] :

- schéma agoniste long : il commence par des injections d'agonistes de la GnRH lors de la phase lutéale du cycle précédent ou en début de cycle. Ces injections stimulent d'abord la sécrétion de FSH et de LH par l'hypophyse : c'est l'effet « flare-up ». Ensuite, la poursuite des injections entraîne une désensibilisation des cellules gonadotropes hypophysaires avec effondrement de la sécrétion de FSH et de LH endogènes et chute de l'oestradiol et de la progestérone. Une fois cette désensibilisation installée, la stimulation est débutée avec les injections de gonadotrophines.
- schéma agoniste court : il commence par des injections d'agonistes de la GnRH en début de cycle. Ici, l'effet « flare-up » est utilisé pour initier la COH qui sera poursuivie par des injections de gonadotrophines. Ce traitement est indiqué chez les patientes avec une diminution de la réserve ovarienne.
- schéma antagoniste : il commence par des injections de gonadotrophines en début de cycle. L'antagoniste de la GnRH est injecté quelques jours plus tard pour empêcher le pic spontané de LH ; en effet, l'antagoniste entraîne un effondrement de la synthèse de FSH et de LH endogènes sans effet « flare-up ». Ces schémas plus récents permettent de raccourcir la durée de la stimulation, d'utiliser une dose moins élevée de gonadotrophines et de diminuer le risque d'hyperstimulation ovarienne (Voir §2.4.6.). Ce traitement est donc indiqué chez les patientes avec une réserve ovarienne normale ou élevée.

Les injections de gonadotrophines et d'agonistes ou antagonistes de la GnRH sont poursuivies jusqu'au jour du déclenchement de l'ovulation. Lors de la COH, une surveillance échographique et biologique permet de mesurer la croissance des follicules et de l'endomètre, ainsi que de suivre les taux hormonaux d'oestradiol, de progestérone et de LH. Cette double surveillance a pour objectif de prévenir une hyperstimulation ovarienne et de déterminer le moment idéal du déclenchement de l'ovulation. Typiquement, le déclenchement est programmé quand 2 ou 3 follicules ont atteint un diamètre de 16-18 mm avec des taux d'oestradiol d'environ 200 à 250 pg/ml par follicule de diamètre ≥ 14 mm. L'ovulation est le plus souvent déclenchée par l'injection de hCG dans les 34 à 38h qui précèdent la ponction.

Certains cycles de FIV sont réalisés en cycle naturel, par rapport au cycle stimulé décrit précédemment. En cycle naturel, les patientes ne reçoivent pas de traitement par gonadotrophines et l'ovulation est déclenchée quand le follicule dominant atteint un diamètre ≥ 16 mm [127]. Les avantages potentiels du cycle naturel sont l'absence d'injections de gonadotrophines avec amélioration de la tolérance et diminution du coût du traitement, l'absence de risque d'hyperstimulation ovarienne, ainsi que des taux hormonaux sériques physiologiques par rapport aux cycles stimulés, ce qui pourrait améliorer la réceptivité endométriale. De plus, la durée du cycle est plus courte et la ponction ovarienne plus aisée. Un cycle naturel modifié peut également être utilisé ; un traitement par antagoniste de la GnRH et gonadotrophines à faible dose est débuté en fin

de phase folliculaire pour éviter une ovulation prématurée et soutenir la croissance du follicule dominant [128]. Ces schémas en cycle naturel sont souvent proposés chez les patientes dites « mauvaises répondeuses » qui obtiennent peu de follicules malgré des doses élevées de gonadotrophines, mais pourraient aussi être utilisés chez les « bonnes répondeuses », pour éviter les complications de la COH [128].

2.4.2. Ponction ovocytaire et recueil des spermatozoïdes

Elle est le plus souvent réalisée par voie vaginale sous contrôle échographique. Un guide est connecté à la sonde endovaginale et permet d'aspirer à l'aide d'une aiguille le contenu des follicules de plus de 14 mm dans des tubes de collecte. Ces tubes sont ensuite transmis au laboratoire pour récupérer les COC contenus dans le FF à l'aide d'une loupe binoculaire. La loi belge autorise la ponction ovocytaire jusqu'à la veille du 46^{ème} anniversaire de la patiente.

La ponction peut être réalisée sous anesthésie générale, sous neuroleptiques et/ou sous anesthésie locale. Les complications potentielles sont des lésions vasculaires, coliques ou vésicales, une infection péritonéale et une hémorragie vaginale au niveau des points de ponction.

Dans le même temps, les spermatozoïdes sont obtenus par masturbation et le sperme est préparé au laboratoire. Cela permet d'éliminer le liquide séminal qui empêche la fécondation et de concentrer les spermatozoïdes mobiles [124].

2.4.3. Fécondation et culture embryonnaire

Il existe 2 techniques de fécondation des embryons : la fécondation *in vitro* classique (FIV) et l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) [124].

La fécondation doit être réalisée dans les heures qui suivent la maturation de l'ovocyte et l'émission du 1^{er} globule polaire. Le plus souvent, les ovocytes sont laissés quelques heures dans l'incubateur avant la fécondation, pour permettre à certains ovocytes d'achever leur maturation nucléaire *in vitro*.

Dans la FIV classique, les ovocytes sont déposés dans une boîte de culture et sont inséminés *in vitro* dans une concentration de 0,05 à 0,1 x 10⁶ spermatozoïdes mobiles par ml. Cette concentration permet d'optimiser le taux de fécondation tout en limitant le risque de polyspermie, c'est-à-dire la pénétration de plus d'un spermatozoïde dans l'ovocyte. Cette insémination peut être réalisée dans des puits contenant plusieurs ovocytes ou dans des microgouttes contenant 1 ovocyte, ce qui permet de suivre le développement embryonnaire individuellement. 18h après l'ajout des spermatozoïdes, les ovocytes sont décoronés, c'est-à-dire séparés du cumulus oophorus, pour vérifier leur fécondation.

L'ICSI est utilisée en cas d'anomalie du spermogramme pour augmenter le taux de fécondation. Elle consiste à injecter directement un spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovocyte. Les spermatozoïdes peuvent être obtenus à partir d'un éjaculat ou d'une biopsie testiculaire en cas d'azoospermie obstructive. Elle nécessite une décoronisation des ovocytes par une double action enzymatique (incubation dans du milieu de culture contenant de la hyaluronidase) et mécanique (aspiration puis

refoulement des ovocytes dans une micropipette). Seuls les ovocytes ayant atteint le stade de la 2^{ème} métaphase seront injectés. La micro-injection nécessite un microscope inversé combiné à un équipement spécifique composé de deux micropipettes fixées sur des micromanipulateurs et reliées à des seringues. La micropipette de contention permet de maintenir l'ovocyte et la micropipette d'injection sert à prélever le spermatozoïde et à l'injecter dans le cytoplasme de l'ovocyte. Les seringues permettent d'aspirer ou de refouler les spermatozoïdes et les ovocytes. Les spermatozoïdes sont placés dans un milieu visqueux, dans le but de ralentir leurs mouvements et de faciliter leur aspiration.

Les embryons sont cultivés *in vitro* jusqu'au 2^{ème} ou 3^{ème} jour (embryon au stade de clivage) ou jusqu'au 5^{ème} ou 6^{ème} jour post-ponction (blastocyste). Des critères morphologiques sont utilisés pour évaluer la qualité embryonnaire et déterminer quel embryon sera transféré, cryopréservé ou détruit (Voir §3.1.).

2.4.4. Transfert d'embryon(s) frais

Le ou les embryon(s) sélectionné(s) sont monté(s) dans un cathéter par le biologiste. L'orifice cervical est nettoyé avec du milieu de culture ou du liquide physiologique, puis un guide est introduit dans l'utérus. Le cathéter contenant le(s) embryon(s) est alors monté dans ce guide. Les embryons sont déposés dans la partie haute de l'utérus en évitant de toucher le fond utérin, grâce à un contrôle échographique. Le test de grossesse est réalisé 12 à 14 jours après le transfert [124].

En Belgique, le nombre d'embryons pouvant être transférés est déterminé par la loi dans le but de limiter les grossesses multiples. Ce nombre maximal dépend de l'âge de la patiente, du rang de la tentative et de la qualité embryonnaire (Voir §3.1.4) (Table 2). La loi belge autorise le transfert d'embryon jusqu'à la veille du 48^{ème} anniversaire de la patiente, pour autant que la demande de prise en charge en PMA ait été réalisée avant le 46^{ème} anniversaire.

Table 2 Loi belge déterminant le nombre d'embryons transférés en PMA. Adapté des pratiques du Centre de Procréation Médicalement Assistée (CPMA) de l'Université de Liège.

Age de la patiente	Rang de la tentative	Qualité embryonnaire	Nombre maximal d'embryons transférés
Embryons frais			
≤ 35 ans	1	A-B-C	1
	2	A	1
		B-C	2
	3-6	A-B-C	2
≥ 36 et ≤ 39 ans	1-2	A-B-C	2
	3-6	A-B-C	3
≥ 40 et ≤ 45 ans	1-6	A-B-C	au choix
Embryons cryopréservés			
≤ 47 ans	1-6	A-B-C	2

2.4.5. Transfert d'embryon(s) cryopréservé(s)

La loi belge autorise le transfert simultané de maximum 2 embryons cryopréservés, quel que soit l'âge de la patiente ou le rang de la tentative. Il existe 3 protocoles de transfert d'embryon(s) cryopréservé(s) qui sont plus simples que ceux utilisés pour la COH [124] :

- un cycle naturel sans stimulation de l'ovulation chez les patientes ayant un cycle régulier
- une stimulation a minima par citrate de clomiphène ou gonadotrophines permettant d'obtenir une ovulation
- un cycle artificiel avec traitement par œstrogène en continu et ajout de progestérone en deuxième partie de cycle.

2.4.6. Effets secondaires

Ils peuvent être liés à la désensibilisation dans les schémas agonistes longs et à la stimulation dans tous les types de schémas [124].

La désensibilisation entraîne une privation hormonale et peut conduire à des symptômes comparables à ceux de la ménopause (bouffées de chaleur, céphalées, irritabilité, sécheresse vaginale,...).

La stimulation peut être responsable d'une pesanteur pelvienne suite à l'augmentation de taille des ovaires, ainsi que de céphalées, de rétention hydrique et de prise de poids. Cependant, la principale complication est l'hyperstimulation ovarienne qui peut survenir quand de nombreux follicules grandissent en réponse à la COH, avec production de taux élevés d'oestradiol. Elle associe une augmentation du volume ovarien et une augmentation de perméabilité vasculaire entraînant le plus souvent une ascite plus ou moins importante. Les formes sévères peuvent être responsables d'un épanchement pleural voire péricardique, d'une hypovolémie avec oligurie, de troubles ioniques et d'une hypercoagulabilité pouvant aller jusqu'à une détresse respiratoire, une insuffisance rénale aiguë et des accidents thrombo-emboliques. Le VEGF est impliqué dans sa physiopathologie, car il est produit au niveau ovarien en réponse à la COH et augmente la perméabilité vasculaire [129]. Les symptômes apparaissent dans les 3 à 10 jours qui suivent le déclenchement de l'ovulation et peuvent s'aggraver en cas de grossesse, suite à la production de hCG par le trophoblaste. En effet, le hCG se fixe au récepteur de la LH, mais avec une affinité plus élevée et une demi-vie plus longue, et stimule la production de VEGF [129]. Les patientes à risque d'hyperstimulation ovarienne sont les patientes jeunes avec une réserve ovarienne normale ou élevée, en particulier en cas de syndrome des ovaires micropolykystiques (SOMPK). En effet, ces patientes présentent un nombre élevé de follicules antraux qui peuvent être recrutés par la COH. Le risque d'hyperstimulation ovarienne est nettement diminué grâce aux schémas antagonistes qui permettent de déclencher l'ovulation grâce à un agoniste de la GnRH entraînant un pic de LH endogène. Le hCG n'est donc pas utilisé comme déclencheur de l'ovulation et son effet prolongé sur le récepteur de la LH est évité [129].

2.4.7. Evaluation des résultats de la FIV

Plusieurs critères peuvent être utilisés pour évaluer le succès de la FIV [130] :

- le *taux d'implantation* qui correspond au nombre de sacs gestationnels intra-utérins avec ou sans activité cardiaque divisé par le nombre d'embryons transférés
- le *taux de grossesse clinique* qui correspond au nombre de grossesses diagnostiquées par la mise en évidence d'un ou plusieurs sacs gestationnels à l'échographie pour 100 cycles initiés, pour 100 ponctions ovocytaires ou pour 100 transferts d'embryon. Ce taux inclut les grossesses ectopiques, mais exclut les grossesses biochimiques diagnostiquées uniquement par la détection du hCG au niveau du sang ou des urines, sans visualisation d'un sac gestationnel à l'échographie.
- le *taux d'accouchement* qui correspond au nombre d'accouchements pour 100 cycles initiés, pour 100 ponctions ovocytaires ou pour 100 transferts d'embryon. Il peut s'agir de l'accouchement d'1 ou plusieurs enfant(s) né(s)-vivant(s) ou mort(s)-né(s).
- le *taux de naissance vivante* qui correspond au nombre d'accouchements avec au moins 1 enfant né vivant pour 100 cycles initiés, pour 100 ponctions ovocytaires ou pour 100 transferts d'embryon.

2.4.8. Résultats des centres de fertilité belges

(D'après le *Rapport du registre belge de procréation assistée (BELRAP), 2016* [131])

Sur 100 cycles initiés, 90% ont bénéficié d'une ponction ovocytaire, qui a permis de recueillir au moins 1 ovocyte dans 88% des cas et d'inséminer 1 ovocyte par FIV ou ICSI dans 86% des cas. Dans 80% des cas, au moins 1 ovocyte a été fécondé et, chez respectivement 67% et 41% des patientes, au moins 1 embryon a pu être transféré et cryopréserver.

Les indications de recours à la PMA étaient masculines dans 28% des cas, féminines dans 23% des cas, mixtes dans 18% des cas et idiopathiques ou inconnues dans 22% et 9% des cas. Parmi les principales causes féminines, on retrouve les troubles de l'ovulation (41%), les causes tubaires (41%), l'endométriose (33%), les causes utérines (11%), l'insuffisance ovarienne prématurée (7%) et les anomalies génétiques (4,5%). L'âge médian de recours à la FIV était de 35 ans chez la femme. Chez l'homme, on observe des anomalies du spermogramme dans 98% des cas et des anomalies génétiques dans 6,5% des cas.

Les schémas antagonistes ont été utilisés dans 55% des cas, alors que les schémas agonistes courts et longs représentaient respectivement 22 et 19% des cas. Dans 4% des cas, aucune stimulation n'a été utilisée. Les transferts d'embryons cryopréserverés ont été réalisés en cycle naturel dans 50% des cas, en cycle artificiel dans 44% des cas et après stimulation dans 6% des cas.

L'ICSI a été utilisée comme méthode de fécondation chez 76% des patientes, la FIV classique chez 16% d'entre elles et une combinaison des 2 méthodes chez les 8%

restantes. La politique de transfert mono-embryonnaire se généralise ces dernières années, puisque l'on constate que 63,5% des transferts frais étaient mono-embryonnaires, contre 31,5% de transferts de deux embryons et seulement 5% de transferts de plus de 2 embryons. La majorité des patientes (91,5%) ont accouché d'un singleton, pour 8,4% de grossesses gémellaires et 0,1% de grossesses triples.

Les 2 tableaux suivants (Tables 3 et 4) représentent différents indicateurs d'évaluation du succès des traitements et les statistiques belges correspondantes en 2016.

Table 3 Taux de grossesse et d'accouchement par ponction ou par transfert d'embryon frais ou cryopréservé. Adapté du rapport du BELRAP, 2016 [131].

Taux (%)	Par ponction*	Par transfert d'embryon frais	Par transfert d'embryon cryopréservé
Grossesse avec hCG +	30,7	37,8	36,3
Grossesse clinique	25,5	31,5	30,0
Grossesse clinique avec activité cardiaque	23,4	28,9	26,7
Accouchement	17,8	22,2	19,4

* Les ponctions avec cryopréservation de tous les embryons pour un transfert lors d'un cycle ultérieur (« freeze all ») sont exclues de ce calcul.

Table 4 Taux de grossesse, d'implantation et d'accouchement par transfert d'embryon frais, en fonction de l'âge de la patiente. Adapté du rapport du BELRAP, 2016 [131].

Taux par transfert d'embryon frais (%)	Age (années)			
	< 36	≥ 36 et < 40	≥ 40 et < 43	≥ 43
Grossesse avec hCG +	43,9	35,9	24,5	11,0
Grossesse clinique	37,2	29,5	19,0	8,4
Grossesse clinique avec activité cardiaque	34,8	26,4	16,6	4,2
Accouchement	28,3	19,4	10,0	1,9

3. Sélection embryonnaire

La sélection embryonnaire a pour objectif de déterminer l'embryon ayant la meilleure qualité et donc le potentiel implantatoire le plus élevé, au sein de la cohorte d'embryons obtenus par FIV.

Une technique de sélection optimale permettrait de diminuer le délai nécessaire à l'obtention d'une grossesse, ainsi que le taux de fausse couche. De plus, une meilleure sélection permettrait de favoriser les transferts d'embryon unique, et ainsi de diminuer le taux de grossesse multiple en FIV. En effet, les transferts d'embryons multiples sont réalisés dans le but d'augmenter les taux de grossesse par transfert puisque, statistiquement parlant, la probabilité d'obtenir une grossesse est plus élevée si l'on transfère deux (ou plus) embryons [132], mais cet avantage est moindre si l'on peut sélectionner des embryons avec un potentiel implantatoire plus élevé [133]. Ces transferts d'embryons multiples représentaient encore 65% des cycles de FIV/ICSI en Europe en 2014, avec un taux de grossesse multiple de 17,5% [134]. Ces grossesses multiples sont associées à des complications spécifiques (prématurité, retard de croissance intra-utérin, mort fœtale *in utero*, diabète gestationnel, pré-éclampsie, admission aux soins intensifs néonataux, handicaps majeurs,...) [135]. Ces grossesses multiples représentent également un coût financier important, qui est surtout lié aux complications de la prématurité, et qui dépasse celui des transferts d'embryon unique répétés [136]. Enfin, une sélection embryonnaire optimale permettrait de limiter le nombre d'embryons cryopréservés [137].

Actuellement, le choix de l'embryon à transférer est basé sur une observation morphologique. Cette technique a prouvé son efficacité [138], mais il n'existe pas de paramètre morphologique unique ou d'algorithme capable de prédire avec certitude la qualité embryonnaire par la morphologie [139]. De plus, cette méthode reste subjective, avec des gradations morphologiques qui varient en fonction du centre de fertilité [140, 141]. En Belgique, les statistiques de 2016 montrent un taux d'accouchement par transfert d'embryon d'environ 20% (Voir §2.4.8.). Au vu de ces résultats, le développement d'une technique de sélection embryonnaire efficace et financièrement acceptable reste un challenge à l'heure actuelle [139].

Dans ce contexte, des biomarqueurs non invasifs de qualité ovocytaire ou embryonnaire ont été étudiés au niveau des cellules de la granulosa, du cumulus oophorus, du fluide folliculaire ou du milieu de culture de l'embryon. Une autre approche est le diagnostic génétique préimplantatoire des aneuploïdies (PGT-A), technique invasive puisqu'elle nécessite l'obtention de cellules embryonnaires. La recherche de ces biomarqueurs a été encouragée par le développement des techniques dites « omiques », qui étudient l'ensemble des gènes (génomique), des ARNm (transcriptomique), des protéines (protéomique) ou des métabolites (métabolomique) présents au sein d'un échantillon biologique de manière non ciblée. Elles sont fréquemment utilisées pour la recherche de biomarqueurs, puisqu'elles permettent d'étudier simultanément de nombreuses molécules [142].

3.1. *Evaluation séquentielle de la morphologie embryonnaire*

Nous allons ici décrire le développement optimal de l'embryon depuis la fécondation jusqu'au stade de blastocyste, ainsi que les critères utilisés au Centre de Procréation Médicalement Assistée (CPMA) de l'Université de Liège pour la gradation morphologique des embryons.

3.1.1. Etapes du développement embryonnaire de la fécondation à l'implantation

Le zygote, dont les 2 pronucléi (2PN) issus de l'ovocyte et du spermatozoïde sont visibles, représente le 1^{er} stade qui suit une fécondation. Ce stade, qui dure de 14 à 23 heures post-insémination (hpi), correspond à la mise en présence des gamètes pour la FIV et à la micro-injection des ovocytes pour l'ICSI au jour 0 (J0). Ensuite, le stade d'amphimixie correspond à la fusion des pronucléi d'origine maternelle et paternelle (Figure 9).

Le premier clivage de l'embryon survient entre 25 et 26 hpi (J1 PM) et celui-ci est alors constitué de 2 cellules. Puis, le stade de 4 cellules est observé entre 42 et 44 hpi (J2 AM) et celui de 8 cellules entre 66 et 68 hpi (J3 AM). Les cellules embryonnaires sont appelées blastomères. A J4, la fréquence des divisions s'accélère et les blastomères subissent un phénomène de compaction pour former une masse de cellules jointives appelée morula. Ces adhérences intercellulaires vont entraîner la ségrégation de certaines cellules au centre de la morula. Enfin, le blastocyste se développe dès J5 avec apparition au sein de l'embryon d'une cavité liquidienne, le blastocèle. Deux types cellulaires se différencient au sein du blastocyste : la masse cellulaire interne qui devient le bouton embryonnaire, et la masse cellulaire externe, qui devient le trophoblaste à l'origine des annexes fœtales. Le phénomène d'expansion du blastocyste a lieu à J5 avec amincissement de la membrane pellucide jusqu'à l'éclosion du blastocyste à J6 (Figure 9).

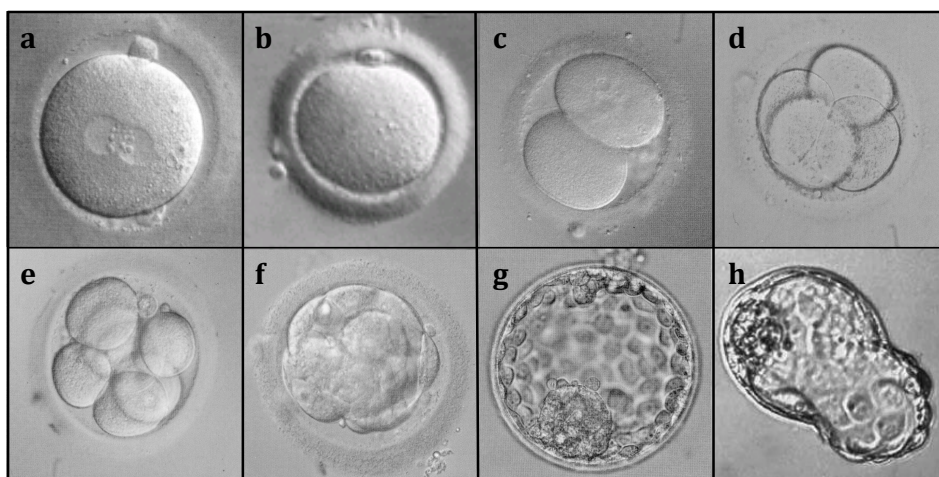


Figure 9 Images microscopiques du développement embryonnaire. (a) Zygote au stade 2 PN. (b) Amphimixie. (c) Stade 2 cellules. (d) Stade 4 cellules. (e) Stade 8 cellules. (f) Morula. (g) Blastocyste. (h) Blastocyste en voie d'éclosion. D'après les images du Centre de Procréation Médicalement Assistée (CPMA) de l'Université de Liège.

Peu d'embryons suivent ce développement optimal ; en effet, les retards ou arrêts du développement sont fréquents. C'est ici qu'intervient l'observation morphologique séquentielle par les biologistes pour classer les embryons en fonction de leur qualité et pour décider quels embryons seront transférés, cryopréservés ou détruits.

3.1.2. Critères d'évaluation des zygotes (16-20 hpi) et timing du premier clivage embryonnaire

A ce stade, le nombre, la taille et la position des pronucléi sont utilisés pour évaluer la qualité du zygote. Idéalement, celui-ci présente 2 pronucléi de taille égale localisés au centre du cytoplasme. De plus, le timing du premier clivage est un critère de qualité important et celui-ci doit être observé entre 24 et 26 hpi.

3.1.3. Critères d'évaluation morphologique des embryons à J2 et J3

L'évaluation à J2-J3 comporte 5 critères (Figure 10):

1. le nombre de cellules

A J2 et J3, le nombre idéal est de 4 et 8 cellules respectivement. On parle de retard de développement si l'embryon comporte moins de 4 ou 7 cellules à J2 ou J3 et de développement anormalement rapide si l'embryon est constitué de plus de 5 ou 9 cellules à J2 ou J3.

2. la présence et l'importance de la fragmentation

Les fragments sont des morceaux de cytoplasme anucléés qui sont extrudés des blastomères. La présence d'une fragmentation est signe d'anomalies génétiques, surtout si elle représente un pourcentage important du volume embryonnaire.

3. la taille des cellules

Idéalement, les cellules embryonnaires sont de taille égale. De plus, la forme et la disposition des cellules sont normalement régulières.

4. l'aspect du cytoplasme

Il est idéalement clair et homogène, mais peut parfois être sombre, granulaire ou vacuolaire, ce qui diminue le score attribué à l'embryon présentant ces caractéristiques.

5. le nombre de noyau(x) dans les cellules

Chaque cellule embryonnaire comporte un seul noyau qui est visible ou non selon la phase du cycle cellulaire. La présence de blastomères multinucléés, où plusieurs noyaux sont visibles dans une même cellule, est un signe d'anomalies chromosomiques.

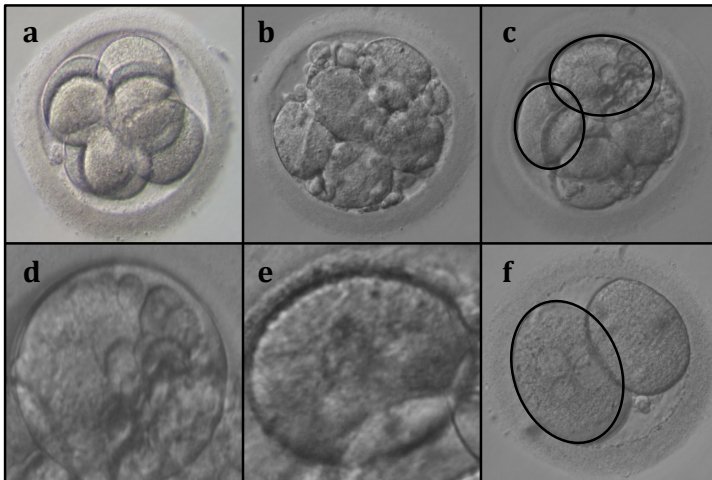


Figure 10 Critères d'évaluation morphologique des embryons. (a) Embryon de bonne qualité. (b) Fragmentation importante. (c) Asymétrie importante des blastomères. (d) Cytoplasme vacuolaire. (e) Cytoplasme granulaire. (f) Blastomère multinucléé. D'après les images du Centre de Procréation Médicalement Assistée (CPMA) de l'Université de Liège.

3.1.4. Gradation morphologique des embryons au stade de clivage (J2-J3)

Ces critères d'évaluation ont un poids variable dans la gradation morphologique des embryons :

- Le 1^{er} critère de choix est l'observation d'un clivage précoce entre 24 et 26 hpi.
- Le 2^{ème} critère de choix est le nombre de cellules.
- La présence de blastomères multinucléés, la taille des cellules, la fragmentation et l'aspect du cytoplasme interviennent ensuite.
- Le dernier critère de choix est l'aspect du zygote.

Ces observations morphologiques sont utilisées pour attribuer un score de qualité « A » (=bonne), « B » (=moyenne) ou « C » (=faible) à chaque embryon de la cohorte. Les embryons dont la qualité est insuffisante pour le transfert sont qualifiés de « D » et sont détruits (Figure 11).

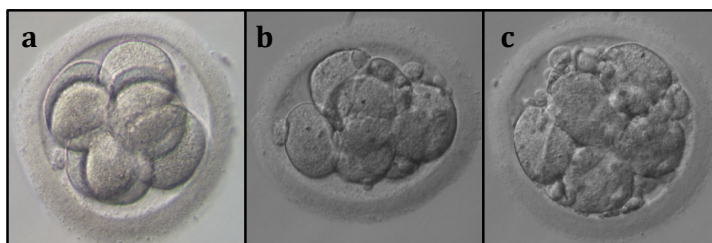


Figure 11 Gradation morphologique des embryons en 3 classes A, B et C. (a) Embryon de bonne qualité ou « A ». (b) Embryon de qualité moyenne ou « B ». (c) Embryon de qualité faible ou « C ». D'après les images du Centre de Procréation Médicalement Assistée (CPMA) de l'Université de Liège.

3.1.5. Critères d'évaluation morphologique des blastocystes à J5 et J6

La première classification morphologique des blastocystes a été proposée par Gardner et Schoolcraft en 1999 [143]. Au CPMA, l'évaluation à J5-J6 comporte 4 critères qui sont par ordre d'importance décroissante (Figure 12):

- la vitesse de développement. En effet, les embryons qui atteignent le stade de blastocyste à J6 (et non J5) ont un retard de développement.
- le type de blastocyste selon sa taille (degré d'expansion) et le volume du blastocèle (degré de cavitation). Les blastocystes sont classés de B1 à B6.
- la qualité du bouton embryonnaire (nombre et disposition des cellules) dès le stade B3.
- la qualité du trophoblaste (nombre et disposition des cellules) dès le stade B3.

Ces critères d'évaluation sont utilisés pour attribuer un score de qualité « A » (=bonne), « B » (=moyenne) ou « C » (=faible) à chaque embryon de la cohorte. Les embryons dont la qualité est insuffisante pour le transfert sont qualifiés de « D ». Tous les embryons qui atteignent le stade B3 sont cryopréservés.

3.1.6. Intérêts de la culture embryonnaire prolongée

Bien que la première grossesse par FIV ait été obtenue après transfert d'un blastocyste, le transfert d'embryon au stade de clivage a prédominé pendant des décennies, car la qualité des premiers milieux de culture ne permettait pas de supporter le développement des blastocystes [143]. Les principaux objectifs de la culture prolongée sont d'obtenir [139, 143, 144] :

- une auto-sélection des embryons à potentiel implantatoire élevé après activation du génome embryonnaire, qui a lieu à partir du 3^{ème} jour du développement
- une meilleure synchronisation entre l'embryon et l'endomètre, puisque l'embryon humain n'atteint normalement pas la cavité utérine avant J4
- une diminution de la contractilité utérine réduisant le risque d'expulsion de l'embryon

Au CPMA, elle est actuellement proposée s'il y a plus de 6 ovocytes fécondés, mais ce critère varie en fonction des cliniques de fertilité [144].

Les bénéfices de cette culture prolongée par rapport à un transfert d'embryon au stade de clivage ne sont pas encore clairement établis. Une revue récente de littérature a montré que le taux de naissance vivante était plus élevé après transfert frais de blastocyste avec un odds ratio de 1.48 [144]. Ceci signifie que, pour un taux de naissance vivante de 29% après transfert d'un embryon frais au stade de clivage, on peut attendre un taux de 32 à 42% après transfert d'un blastocyste. Cependant, le taux cumulé de grossesse après transfert des blastocystes frais et congelés issus d'une ponction ovocytaire n'était pas augmenté, et la fréquence des grossesses multiples et des fausses couches n'était pas modifiée. De plus, le taux de cryopréservation embryonnaire était diminué et le pourcentage d'échec de transfert embryonnaire était majoré dans le groupe blastocystes. Ainsi, si 60% des patientes bénéficient d'une cryopréservation d'embryons au stade de clivage, ce chiffre tombe entre 37 et 46% au stade de blastocyste. Pour 1% d'échec de transfert d'embryon à J2-J3, on aurait 2 à 4% d'échecs avec les blastocystes. Cependant, les preuves scientifiques restent de faible qualité suite à un risque élevé de biais au niveau des études randomisées contrôlées (RCT) analysées

[144]. Enfin, la culture prolongée pourrait augmenter le taux de grossesse gémellaire monozygote et favoriser le développement d'embryons masculins, suite à l'effet du milieu de culture et/ou de la méthode de sélection (les embryons masculins se développeraient plus rapidement).

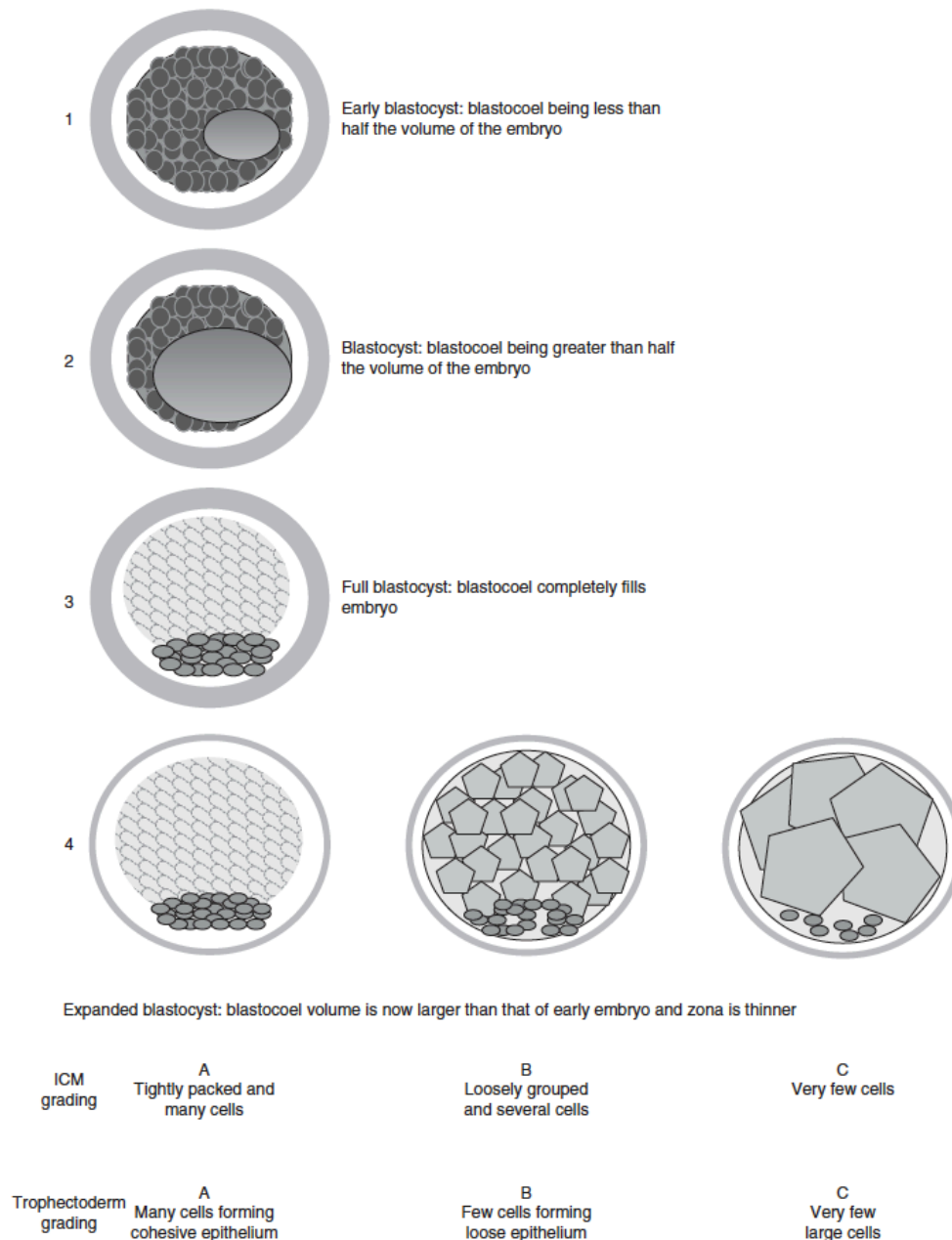


Figure 12 Gradation morphologique du blastocyste. Type B1 : le blastocèle occupe moins de la moitié du volume embryonnaire. Type B2 : le blastocèle occupe plus de la moitié du volume embryonnaire. Type B3 : le blastocèle occupe tout le volume embryonnaire. Type B4 : le blastocyste est complètement expansé et le blastocèle est plus volumineux que l'embryon initial avec amincissement de la zone pellucide. Type B5 : le blastocyste est en voie d'éclosion et commence à sortir de la zone pellucide. Type B6 : le blastocyste est éclos. A partir du stade B3, la qualité du trophoblaste et du bouton embryonnaire est également évaluée, en fonction du nombre et de la disposition des cellules. Adapté du livre de *Gardner et Schoolcraft, Textbook of assisted reproductive techniques, 2012 [145]*.

3.2. *Evaluation continue de la morphologie embryonnaire*

Le système de « time-lapse » est un appareil qui enregistre des images de l'embryon à intervalles réguliers et permet de suivre son développement morphocinétique. Cet appareil peut être introduit dans un incubateur classique, mais il existe également des systèmes combinés « incubateur/time-lapse », qui permettent d'observer l'embryon dans un système clos.

Les avantages potentiels de cette technique par rapport à l'observation séquentielle classique sont [146] :

- un monitoring continu et non invasif, qui permet d'observer des événements transitoires du développement embryonnaire
- un environnement de culture stable, sans modification de température et de composition gazeuse et sans manipulation humaine, puisque l'embryon ne doit plus être sorti de l'incubateur pour réaliser l'évaluation morphologique
- la possibilité d'utiliser un programme de sélection embryonnaire, qui permet une analyse semi-quantitative et non subjective de la morphologie embryonnaire
- la possibilité d'enregistrer des images, ce qui permet de les analyser en différé et d'améliorer la flexibilité du travail, mais aussi de permettre une formation du personnel et d'assurer une traçabilité et une validation de la sélection embryonnaire, dans le but de limiter la subjectivité de l'analyse morphologique.

3.3. *Evaluation de la morphologie ovocytaire*

Grâce à son stock d'ARNm et de protéines, un ovocyte de qualité est capable de terminer la division méiotique, d'être fécondé par un seul spermatozoïde et de supporter les premières divisions de l'embryon jusqu'à l'activation de son génome [147]. Ce stock d'ARNm et de protéines est constitué lors de la maturation de l'ovocyte, avant l'ovulation [148]. Environ 30% des ovocytes prélevés en PMA donnent des embryons de qualité suffisante pour être transférés ou cryopréservés, et environ 5% de ces ovocytes donnent naissance à un bébé vivant chez les patientes de moins de 37 ans. Ce chiffre chute en-dessous de 4% au-delà de 38 ans et de 1% après 42 ans [137, 149]. Au vu de ces résultats, le développement d'une technique de sélection ovocytaire efficace pourrait améliorer le succès des traitements de PMA.

Les critères morphologiques proposés évaluent la structure et l'aspect au microscope du cumulus oophorus, de l'espace périvitellin, du globule polaire, de la zone pellucide, du cytoplasme de l'ovocyte et du fuseau méiotique. Certaines équipes ont également étudié l'intérêt d'une combinaison de plusieurs facteurs morphologiques [150]. Un cytoplasme homogène, clair, sans inclusion ni vacuole, un fuseau méiotique visible, vertical et compact, une zone pellucide claire et d'épaisseur normale, un globule polaire de taille normale, de forme régulière, lisse et non fragmenté, un espace périvitellin non élargi ne contenant pas d'inclusion, et un cumulus bien expansé ont été proposés comme marqueurs de qualité ovocytaire [147, 150-152].

Cependant, il n'y a pas actuellement de consensus sur les critères morphologiques définissant un ovocyte de bonne qualité et l'évaluation de la morphologie ovocytaire reste subjective et peu utilisée [150, 152]. En FIV, seul l'aspect du cumulus peut être évalué, alors qu'en ICSI, l'ovocyte est séparé du cumulus, ce qui

permet une analyse morphologique plus poussée. Cependant, seul le stade de maturation nucléaire est actuellement pris en compte et tous les ovocytes en 2^{ème} métaphase de la méiose sont injectés.

3.4. Evaluation de biomarqueurs au niveau des cellules de la granulosa et du cumulus oophorus

L'analyse de l'ARN exprimé au niveau des cellules de la granulosa et du cumulus oophorus représente une méthode non invasive d'évaluation de la qualité de l'ovocyte. En effet, des contacts étroits et bidirectionnels entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa et du cumulus oophorus sont nécessaires au déroulement normal de la folliculogénèse et à la maturation ovocytaire [148, 153]. Les substrats énergétiques et de biosynthèse de macromolécules (acides aminés, nucléotides,...) utilisés par l'ovocyte proviennent également de ces cellules [154, 155]. Ainsi, le développement des cellules de la granulosa et du cumulus oophorus se déroule en parallèle de celui de l'ovocyte et au sein du même environnement ; l'analyse de ces cellules pourrait donc renseigner sur l'état de l'ovocyte [148].

Les cellules de la granulosa sont obtenues par centrifugation de FF ponctionnés individuellement [156], alors que les cellules du cumulus oophorus sont obtenues au moment de la décoronisation des ovocytes [157]. Le recueil des cellules du cumulus oophorus implique donc d'utiliser l'ICSI pour la fécondation des embryons, puisque cette décoronisation n'est pas réalisée en FIV classique.

Les techniques d'analyse de l'ARN comprennent les microarrays et le séquençage à haut débit pour l'analyse simultanée d'un grand nombre de gènes (étude du transcriptome), ainsi que la PCR quantitative (qPCR) pour l'étude de gènes spécifiques. Le microarray et la qPCR sont couramment combinés ; en effet, le microarray permet de mettre en évidence les gènes candidats potentiellement importants, puis la qPCR permet de valider les résultats, puisqu'elle permet une quantification plus précise des taux d'ARNm [148]. Ces techniques ont permis de mettre en évidence, au niveau des cellules de la granulosa ou du cumulus oophorus, des gènes candidats qui sont associés à la maturation ovocytaire, au taux de fécondation, au développement d'un blastocyste, à la présence d'aneuploïdies chez l'embryon, ainsi qu'au taux de grossesse clinique ou de naissance vivante [148, 154, 158]. Des algorithmes de sélection combinant plusieurs de ces gènes candidats ont également été proposés. Globalement, l'activité transcriptionnelle est augmentée au niveau des cellules de la granulosa ou du cumulus oophorus qui sont associées à des ovocytes donnant une naissance vivante. Les taux d'ARNm sont ainsi augmentés pour la plupart des gènes candidats [148].

Cependant, les gènes candidats identifiés varient fortement entre les études, majoritairement unicentriques [148]. De plus, la plupart des études sont observationnelles et le bénéfice de cette méthode de sélection embryonnaire, ainsi que son applicabilité en routine clinique, ne sont pas encore établis [148, 154, 158]. Une première étude prospective interventionnelle vient d'être publiée en 2019 ; cette étude a évalué l'intérêt de la quantification de 3 gènes candidats (ephrin-B2 (EFNB2), SAM and SH3 domain-containing protein 1 (SASH1), calcium/calmodulin-dependent protein

kinase 1D (CAMK1D)) au niveau du cumulus oophorus (Corona test) en association avec la morphologie à J3 et montre des résultats encourageants [157].

Même si la majorité des études ont évalué le transcriptome des cellules de la granulosa et/ou du cumulus oophorus comme marqueur de qualité ovocytaire, le profil d'expression des micro ARN (miARN) a également été associé au taux de naissance vivante [159]. Enfin, le nombre de copies d'ADN mitochondrial au niveau des cellules de la granulosa a également été associé au développement d'un embryon de bonne qualité morphologique [160, 161].

3.5. Evaluation de biomarqueurs au niveau du fluide folliculaire (FF)

La formation du FF est liée à la production de molécules ayant un pouvoir osmotique par les cellules de la granulosa (hyaluronan, versican,...) ; ce gradient osmotique attire ensuite du fluide provenant des vaisseaux de la thèque [162]. Le contenu du FF dépend donc du passage d'éléments plasmatiques à travers le follicule et de l'activité sécrétoire des cellules de la granulosa, de la thèque, et, dans une moindre mesure, de l'ovocyte [163]. La concentration en composants de faible poids moléculaire est identique à celle du plasma, alors que la concentration en molécules plasmatiques de plus de 100 kDa est inférieure à celle du plasma [162]. Le FF contient des hormones (gonadotrophines, hormones stéroïdiennes, corticoïdes,...), des facteurs de croissance, des cytokines et chémokines, des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des antioxydants, des protéines, des acides nucléiques, des acides aminés, des lipides, des carbohydrates, des nucléotides, des vésicules extracellulaires chargées de protéines et de miARN,... [153, 163-165]. La composition du FF est dynamique et varie au cours de la folliculogénèse [153, 158]. De plus, le contenu du FF en gonadotrophines et en hormones stéroïdiennes est modifié par la stimulation ovarienne en FIV [153, 166]. La composition du FF pourrait aussi dépendre de la cause de l'infertilité et des caractéristiques de la patiente (âge, poids,...) [158, 163, 164].

Le FF est en contact étroit avec l'ovocyte et constitue le milieu où transitent les facteurs de signalisation entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa et du cumulus oophorus lors de la folliculogénèse. L'analyse des composants du FF pourrait donc représenter une méthode non invasive d'évaluation de la qualité de l'ovocyte. Le contenu du FF a été étudié en relation avec la maturité nucléaire de l'ovocyte, le taux de fécondation, le développement subséquent de l'embryon et le taux de grossesse [153].

Les taux folliculaires des gonadotrophines FSH et LH et du hCG sont liés à la maturité ovocytaire et au taux de fécondation de l'ovocyte [163]. Une concentration folliculaire élevée en E2 et basse en T avec un rapport E2/T élevé serait associée au taux de grossesse [163].

La concentration folliculaire de vitamine D pourrait être négativement corrélée aux taux de fécondation, de grossesse et de naissance vivante, mais ce résultat est controversé [167].

Le taux d'ADN libre folliculaire est négativement associé à la qualité morphologique de l'embryon et au taux de grossesse [168, 169].

La qualité de l'ovocyte a également été reliée à la concentration de différentes protéines folliculaires, notamment à des taux plus élevés d'IL-8 et -18, de bone morphogenetic protein 15 (BMP15), d'amphiréguline (AREG), de growth differentiation factor 9 (GDF-9),... ainsi qu'à des taux abaissés d'IL-15, de VEGF, de TNF- α ,... [153, 158, 163]. Des

résultats contradictoires ont été rapportés pour certaines protéines comme l'IL-1 ou l'IL-6 [153, 158, 163].

Des techniques de protéomique et de métabolomique ont été utilisées pour déterminer le contenu global du FF en protéines et en métabolites de faible poids moléculaire [142, 164, 170], mais peu d'études ont analysé des indicateurs de succès en FIV. Des variations du protéome et du métabolome des FF individuels ont été rapportées en fonction du taux de fécondation de l'ovocyte [171, 172]. Des variations du métabolome sont également liées au taux de clivage de l'embryon [173] et au taux de grossesse [173, 174].

Des concentrations élevées de ROS et abaissées d'antioxydants sont plus fréquentes en cas d'échec de grossesse en FIV [153].

Le contenu du FF en miARN a été associé au taux de fécondation de l'ovocyte et au développement d'un embryon de bonne qualité morphologique à J3 [175, 176].

La plupart de ces études ont montré une corrélation entre le contenu du FF et un paramètre de qualité ovocytaire ou embryonnaire, mais n'ont pas été réalisées à large échelle ou de manière prospective. A l'heure actuelle, l'évaluation de biomarqueurs au niveau du FF n'est pas utilisée en routine clinique.

Notre travail s'est intéressé à un nouveau biomarqueur de qualité ovocytaire au niveau du FF, le *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) [177] (Voir §4.3.).

3.6. Evaluation de biomarqueurs au niveau du milieu de culture des embryons

L'embryon modifie son milieu de culture en consommant des nutriments et en produisant des métabolites. Des techniques de protéomique [178] et de métabolomique [142, 179] ont été utilisées au niveau du milieu de culture, pour évaluer de manière non invasive la qualité embryonnaire.

Les protéines sécrétées par l'embryon dans le milieu de culture, ou sécrétome, varient au cours de son développement [178]. Des variations de ce sécrétome ont pu être associées au développement d'un blastocyste (augmentation de l'ubiquitine), à la présence d'aneuploïdies chez l'embryon (augmentation de lipocalin 1), à l'implantation embryonnaire (diminution de C-X-C motif chemokine 13 (CXCL13), de granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) et de l'apolipoprotéine A1) et au taux de grossesse [178, 180-182].

Le métabolisme de l'embryon varie également au cours de son développement [178]. La consommation de pyruvate et de glucose, ainsi que de certains acides aminés, a été associée positivement au développement de l'embryon [179]. Grâce à des techniques de spectroscopie, le métabolome de l'embryon a été comparé de manière rétrospective entre des embryons avec naissance vivante ou échec d'implantation. Ces études ont montré une différence de métabolome entre ces 2 catégories d'embryons et entre des embryons de score morphologique identique, suggérant que l'analyse du milieu de culture de l'embryon pouvait être combinée à l'analyse morphologique pour améliorer l'efficacité de la sélection embryonnaire [179]. Ces résultats ont conduit au développement d'un outil commercial d'évaluation du milieu de culture embryonnaire (index de viabilité), qui a été testé en combinaison avec le score morphologique, dans des RCT [183-185]. Cet outil a été retiré du marché suite aux résultats décevants de ces

études, qui n'ont pas montré d'amélioration du taux de grossesse clinique ou de naissance vivante. Une étude récente a montré que l'analyse du métabolome pourrait être utilisée pour identifier les embryons euploïdes de manière non invasive [186].

Le contenu en miARN du milieu de culture a été associé à la technique de fécondation (FIV VS ICSI), au taux d'aneuploïdie de l'embryon et au taux de grossesse en FIV [187, 188]. Une analyse du miARNome a montré une diminution du répertoire de miARN et du contenu en vésicules extracellulaires dans le milieu de culture des embryons implantés [189]. Une augmentation du taux de grossesse a également été observée pour les embryons dont le milieu de culture contenait une plus faible quantité de vésicules extracellulaires chargées d'acides nucléiques [190]. L'évaluation des miARN et des vésicules extracellulaires n'est pas utilisée en clinique à l'heure actuelle [189].

Le milieu de culture embryonnaire contient de l'ADN libre libéré par l'embryon, qui pourrait être utilisé pour rechercher des aneuploïdies embryonnaires de manière non invasive [191] (Voir §3.8.). Il contient également de l'ADN mitochondrial ; le ratio entre ADN mitochondrial et ADN génomique pourrait être associé au développement d'un blastocyste de bonne qualité morphologique et au taux d'implantation [192].

3.7. *Evaluation de biomarqueurs au niveau du fluide blastocélique*

Le fluide blastocélique est en contact direct avec le bouton embryonnaire et pourrait contribuer au développement de l'embryon [193]. L'analyse de la composition du fluide blastocélique pourrait donc être utilisée pour évaluer la qualité embryonnaire, mais cette technique n'est pas encore appliquée en clinique. L'aspiration du fluide blastocélique ne semble pas altérer le développement de l'embryon et est techniquement plus simple que la biopsie de cellules embryonnaires [194].

Une étude préliminaire a montré qu'il était possible d'évaluer le métabolisme du blastocyste, non pas de manière indirecte au niveau du milieu de culture, mais de manière directe au niveau du fluide blastocélique [195]. L'analyse du métabolome au niveau du fluide blastocélique n'a pas encore été évaluée en tant que marqueur de qualité embryonnaire. Des techniques de protéomique ont montré une différence d'expression des protéines blastocéliques en fonction de l'âge de la patiente et du taux d'aneuploïdie de l'embryon [196, 197]. L'analyse du fluide blastocélique pourrait permettre d'éviter l'effet de dilution lié au milieu de culture embryonnaire intrinsèquement riche en protéines.

Des vésicules extracellulaires et des miARN sont présents au niveau du fluide blastocélique et pourraient contribuer à la communication entre les cellules du blastocyste et au développement de l'embryon [198].

Il est également possible d'obtenir, au niveau du fluide blastocélique, de l'ADN libre, qui pourrait être utilisé pour rechercher des aneuploïdies embryonnaires de manière minimalement invasive [193]. L'analyse de l'ADN au niveau du fluide blastocélique pourrait limiter le risque de contamination par de l'ADN extra-embryonnaire ; en effet, le milieu de culture peut notamment contenir de l'ADN du cumulus oophorus [191, 194, 198].

3.8. Diagnostic génétique préimplantatoire des aneuploïdies

Plusieurs techniques de génomique ont été utilisées pour rechercher des aneuploïdies, correspondant à des anomalies du nombre de copies des chromosomes, et ainsi transférer des embryons euploïdes. En effet, l'aneuploïdie serait une cause majeure d'échec d'implantation en FIV [199] et de fausse couche précoce en général [200], ce qui explique l'intérêt potentiel de cette technique. Le taux d'aneuploïdie est élevé chez les embryons au stade de clivage, mais aussi chez les blastocystes [123]. L'analyse morphologique de l'embryon ne permet pas d'exclure une aneuploïdie et le taux d'aneuploïdie augmente avec l'âge maternel [123, 199]. De plus, le taux d'aneuploïdie des chromosomes sexuels pourrait être majoré chez les hommes avec une oligospermie sévère [201].

Ces techniques de génomique sont invasives, puisqu'elles nécessitent d'obtenir des cellules embryonnaires par biopsie. Dans les premières études, une biopsie de 1 ou 2 blastomère(s) était réalisée à J3 [202], mais les nouvelles techniques privilégient la biopsie de trophoctoderme à J5, qui serait moins délétère [203]. De plus, la biopsie à J5 permet d'obtenir plus de cellules, ce qui peut améliorer la précision du diagnostic [204]. Une incision est réalisée au niveau de la zone pellucide à J3 pour assister l'éclosion du blastocyste. La biopsie est réalisée à J5 (ou J6) si une quantité suffisante de cellules du trophoctoderme fait protrusion à travers cette incision [205]. Par ailleurs, l'analyse génétique peut également être réalisée sur les globules polaires [206], même si la plupart des centres réalisent actuellement la biopsie sur l'embryon à J5. Comme décrit précédemment, des études sont actuellement en cours pour réaliser le PGT-A de manière non invasive (niPGT-A) sur de l'ADN libre obtenu à partir du fluide blastocélique (technique mini invasive), ou à partir du milieu de culture de l'embryon (technique non invasive) [191, 193, 194].

Un transfert d'embryon frais est possible à J6, si la biopsie a pu être réalisée à J5 et que les résultats génétiques sont disponibles avec au moins un embryon euploïde. Les blastocystes qui n'ont pas pu être biopsiés à J5 peuvent être gardés en culture et biopsiés à J6, mais ils devront obligatoirement être cryopréservés pour pouvoir être transférés de façon synchrone avec l'endomètre [205, 207]. Les centres de fertilité qui ne peuvent pas réaliser ces analyses sur place sont obligés de cryopréserver les embryons pour les transférer ultérieurement [208]. Certaines patientes, surtout plus âgées, peuvent n'avoir aucun embryon euploïde [209].

Les premières RCT sur le diagnostic génétique préimplantatoire des aneuploïdies (PGT-A) ont utilisé la technique de Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) pour l'analyse des chromosomes. Il a été démontré que cette technique n'améliorait pas le taux de succès en FIV et pouvait même être délétère [202]. La technique de FISH ne permettait d'analyser qu'une partie des chromosomes [202]. Depuis, de nouvelles techniques de génomique comme le Comparative Genomic Hybridization array (CGH array), la qPCR et, plus récemment, le Séquençage de Nouvelle Génération (NGS), permettent de réaliser une analyse de l'ensemble des chromosomes appelée « Comprehensive Chromosome Screening (CCS) ». Quelques RCT utilisant des techniques de biopsie et d'analyse génomique variables ont montré une amélioration du taux de grossesse clinique et/ou de naissance vivante grâce à la sélection des embryons euploïdes [133, 206, 209, 210], mais une étude multicentrique publiée en 2019 et

Introduction

utilisant les 2 techniques de pointe, c'est-à-dire la biopsie à J5 et le NGS, n'a pas confirmé ces résultats [211]. Cette technique reste donc controversée, mais elle est utilisée dans certains centres de fertilité.

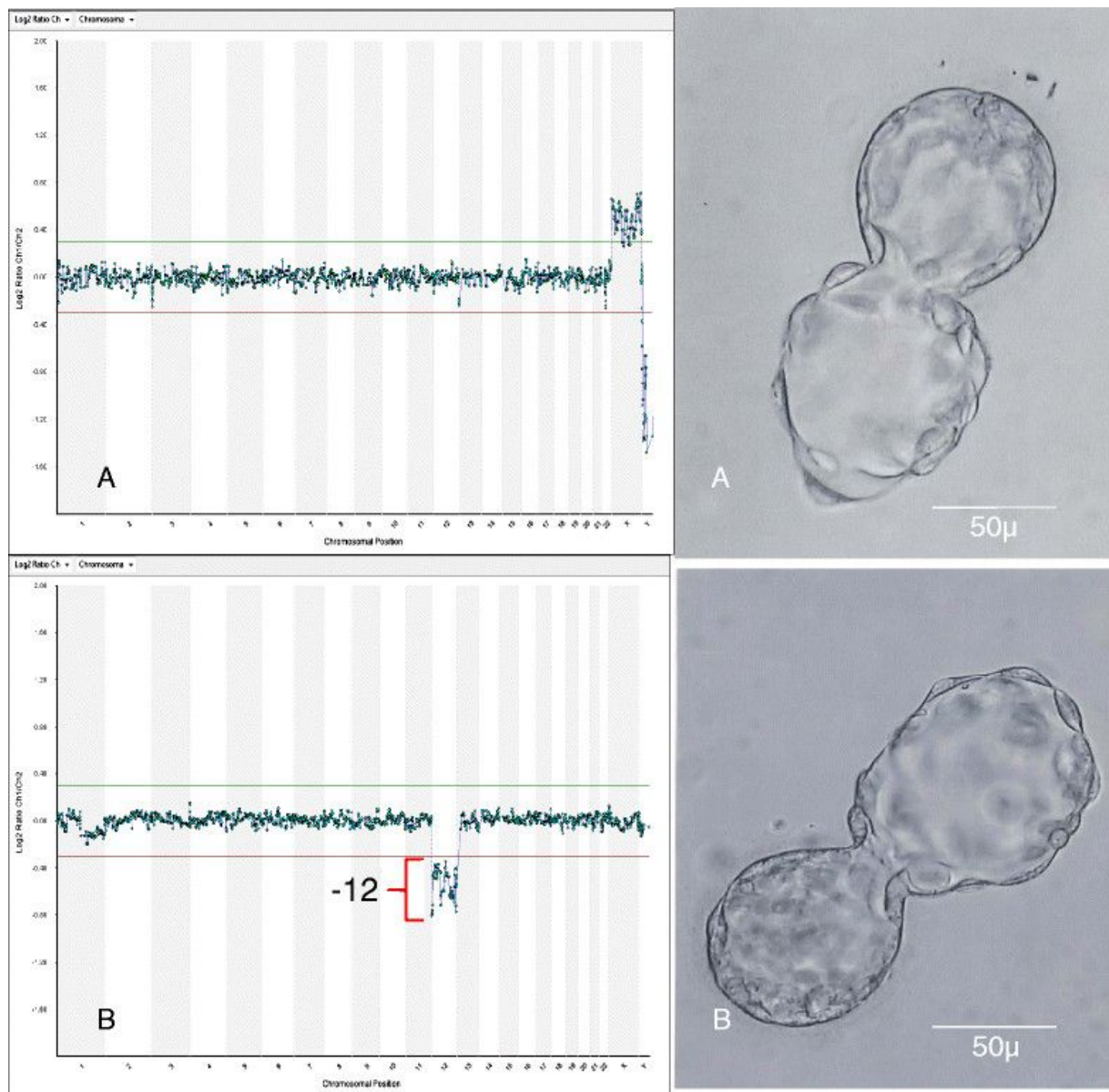


Figure 13 Sélection embryonnaire par l'analyse morphologique et le diagnostic génétique préimplantatoire des aneuploïdies par CGH-array. Les 2 blastocystes sont de qualité morphologique équivalente (grade 5AA). **(A)** Blastocyste euploïde (46,XX). **(B)** Blastocyste aneuploïde présentant une monosomie 12 (45,XY,-12). Adapté de *Yang et al* [210].

Table 5 Récapitulatif des nouveaux marqueurs de qualité ovocytaire et embryonnaire (liste non exhaustive). O = marqueur de qualité ovocytaire / E = marqueur de qualité embryonnaire

Marqueurs non invasifs	Granulosa Cumulus oophorus (O)	Transcriptome	taux de fécondation, aneuploïdie, qualité morphologique embryonnaire, développement du blastocyste, taux de grossesse et de naissance vivante [148, 154, 158] ↑taux de grossesse et de naissance vivante et ↓délai pour obtenir une grossesse si sélection embryon selon morphologie et Corona test [157]
		ADN mitochondrial	↑copies et qualité morphologique embryonnaire [160, 161, 212]
		miARN	taux de naissance vivante [159]
	Fluide folliculaire (O)	Protéines ciblées	facteurs de croissance (↑G-CSF, BMP15, AREG, GDF-9 et ↓VEGF,...), cytokines (↑IL-8 et -18 et ↓IL-15, TNFα,...) [153, 158, 163]
		Protéome	études préliminaires [164, 170], taux de fécondation [171]
		Métabolome	taux de fécondation [172], taux de clivage de l'embryon [173] et taux de grossesse (FF poolés) [173, 174]
		Gonadotrophines Hormones stéroïdiennes	↑FSH, LH ou hCG et taux de fécondation [163] ↑E2/T et taux de grossesse [163]
		Vitamines	↓vitamine D et taux de fécondation, qualité morphologique embryonnaire, taux de grossesse et de naissance vivante (controversé) [167] ; ↑vitamines A et E et taux de fécondation, qualité morphologique embryonnaire à J3 [213]
		ROS+antioxydants	taux de grossesse [153]
		ADN	↓copies et qualité morphologique embryonnaire [168, 169], taux de grossesse [169]
	Milieu de culture embryonnaire (E)	miARN	↑miR-214 et 454 et ↓miR-888 [175], ↑miR-320a et 197 [176] et qualité morphologique embryonnaire à J3
		Sécrétome	développement d'un blastocyste [178], aneuploïdie [178], taux d'implantation [178, 181, 182], taux de grossesse [180]
		Métabolome	RCT sans augmentation du taux de grossesse ou de naissance vivante si sélection embryon selon morphologie et index de viabilité [142, 183-185], aneuploïdie [186]
		ADN et niPGT-A	études préliminaires sur faisabilité et concordance avec PGT-A sur trophoctoderme [191, 194]
		ADN mitochondrial	qualité morphologique embryonnaire, développement du blastocyste, taux d'implantation [192]
Time-lapse (E)	miARN	↓miR-191, 372 et 645 et taux de naissance vivante [187], ↑miR-20a et 30c et taux d'implantation du blastocyste [188] ↓répertoire de miR, ↓vésicules extracellulaires, ↑miR-634 et 29c-3p et taux de grossesse [189]	
	Développement morphocinétique ± programme de sélection	revue de 8 RCT sans preuve d'amélioration du taux de naissance vivante [146]	
Marqueurs mini invasifs	Fluide blastocélique (E)	Protéome	âge maternel et aneuploïdie [196, 197]
		Métabolome	étude préliminaire sur faisabilité [195]
		ADN et niPGT-A	études préliminaires sur faisabilité et concordance avec PGT-A sur trophoctoderme [193, 194]
		miARN	étude préliminaire sur présence de miRNA d'origine embryonnaire [198]
Marqueurs invasifs	Blastomère(s) à J3 (E)	PGT-A	1 RCT avec ↑taux de naissance vivante par transfert et ↓délai pour obtenir une grossesse si sélection embryon(s) euploïde(s) [209]
	Trophoctoderme à J5 (E)	PGT-A	2 RCT avec ↑taux de grossesse et/ou de naissance vivante par transfert [133, 210] et 1 RCT sans ↑taux de grossesse par transfert [211] si sélection embryon(s) euploïde(s)
		ADN mitochondrial	↓copies et euploïdie, taux de grossesse [214] (controversé [212])
Globule polaire (O)	PGT-A	1 RCT avec ↓nombre de transferts pour naissance vivante si sélection embryon(s) euploïde(s) [206]	

4. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) et fertilité

4.1. Généralités sur le G-CSF et son récepteur (G-CSFR)

Le G-CSF a été initialement découvert et purifié chez la souris en 1983 [215], puis la forme humaine (hG-CSF) a été clonée en 1986 par Nagata et al [216]. Le G-CSF est codé par un gène unique [216], qui est localisé sur le chromosome 17 [217]. Il fait partie de la famille des colony stimulating factors (CSF) qui comprend le CSF-1 ou macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), le CSF-2 ou granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), le CSF-3 ou G-CSF et le CSF multipotent ou interleukine 3 (IL-3). Les CSF sont des glycoprotéines de 18 à 70 kDa, dont le nom provient de leur capacité à stimuler la prolifération et la différenciation des leucocytes [218]. Le G-CSF existe sous 2 isoformes de 174 et 177 acides aminés [219].

Le G-CSF est produit par les cellules stromales de la moëlle osseuse, les monocytes/macrophages, les cellules Natural Killer (NK), les lymphocytes T, les cellules dendritiques, mais aussi par des cellules non-hématopoïétiques comme les cellules endothéliales, les fibroblastes, certaines cellules tumorales, certaines cellules du tractus reproducteur,... [219-221]. En effet, les cellules endométriales, les cellules déciduales et trophoblastiques, ainsi que les cellules de la granulosa produisent du G-CSF [222-225].

Le G-CSF a été initialement décrit comme la principale cytokine qui stimule la production, la maturation et la fonction des granulocytes lors de l'hématopoïèse de base et en situation d'urgence ; il peut également augmenter la granulocytose sanguine en libérant des précurseurs à partir de la moëlle osseuse [219, 220, 226]. Les souris déficientes en G-CSF présentent une neutropénie chronique [227]. La concentration sérique de base du G-CSF est très faible chez l'humain, mais augmente rapidement en cas d'exposition à des stimuli inflammatoires [219, 228]. De plus, le G-CSF régule la fonction des monocytes/macrophages (phagocytose et production de cytokines/chémokines) et agit comme médiateur de la tolérance immunitaire au niveau des lymphocytes T [220, 229] : le G-CSF entraîne un déplacement de la balance immunitaire T helper 1 (Th1)/Th2 vers la réponse Th2, stimule les lymphocytes T régulateurs et les cellules dendritiques de type DC2 qui induisent la différenciation des lymphocytes Th2. Le G-CSF pourrait aussi inhiber la cytotoxicité des cellules NK [230].

Le G-CSF possède deux récepteurs de 759 et 812 acides aminés, qui diffèrent par leur partie carboxy-terminale et qui sont codés par un gène localisé sur le chromosome 1 [231, 232]. Le récepteur du G-CSF est exprimé par les cellules progénitrices de la lignée myéloïde, les neutrophiles, les monocytes/macrophages, les cellules NK, les lymphocytes, les plaquettes, mais aussi par des cellules non hématopoïétiques, comme les cellules endothéliales, certaines cellules tumorales et des cellules du système reproducteur,... [233]. En effet, les cellules endométriales, les cellules trophoblastiques et placentaires, les cellules foetales, ainsi que les cellules de la granulosa lutéinisées expriment ce récepteur [224, 225, 234-236].

En médecine, le G-CSF humain recombinant (rhG-CSF) est largement utilisé pour traiter les neutropénies idiopathiques ou induites par les chimiothérapies. Il est également employé pour collecter des cellules souches hématopoïétiques au niveau du

sang périphérique, en vue d'une transplantation ultérieure dans les pathologies hématologiques bénignes et malignes [226].

De multiples travaux récents suggèrent un intérêt du G-CSF dans la prise en charge de l'infertilité [221, 237-240]. En effet, le G-CSF participe au mécanisme de l'ovulation et est un marqueur de qualité ovocytaire prédictif de l'implantation embryonnaire en FIV. De plus, l'utilisation thérapeutique du rhG-CSF est actuellement évaluée dans la prise en charge des endomètres minces réfractaires au traitement classique, des fausses couches à répétition et des échecs d'implantation répétés. Le G-CSF pourrait aussi contribuer au maintien de la réserve ovarienne en cas de chimiothérapie.

4.2. G-CSF et ovulation

Le taux de G-CSF sérique présente un pic au moment de l'ovulation lors d'un cycle spontané [241] et au moment du déclenchement de l'ovulation lors d'un cycle de stimulation ovarienne par gonadotrophines [242, 243] (Figure 14). La leucocytose sanguine augmente également au moment de l'ovulation lors d'un cycle de stimulation ovarienne [243, 244]. Le taux de G-CSF est associé au taux d'oestradiol sérique et est plus élevé chez les bonnes répondeuses, qui présentent un nombre élevé de follicules suite à la stimulation [242]. Au niveau ovarien, l'expression de l'ARNm du G-CSF au niveau des cellules de la granulosa est 10 fois plus élevée en phase folliculaire tardive, juste avant l'ovulation [245]. De plus, l'expression du récepteur au G-CSF augmente lors de la maturation du follicule pré-ovulatoire [246].

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent un rôle du G-CSF dans le mécanisme de l'ovulation. Makinoda a proposé l'hypothèse selon laquelle les leucocytes sont recrutés au niveau de la paroi du follicule en fin de phase folliculaire, suite à une augmentation de production du G-CSF par les cellules de la granulosa [247]. Ces leucocytes participeraient au mécanisme de l'ovulation (Voir §1.2.).

Le G-CSF est actuellement proposé comme traitement d'un trouble de l'ovulation appelé « Syndrome du follicule lutéinisé non rompu (LUF Syndrome) ». Ce syndrome consiste en une lutéinisation du follicule sans expulsion de l'ovocyte et sa fréquence pourrait être diminuée par l'injection sous-cutanée de G-CSF lors des cycles de stimulation ovarienne par citrate de clomiphène ou gonadotrophines [247, 248].

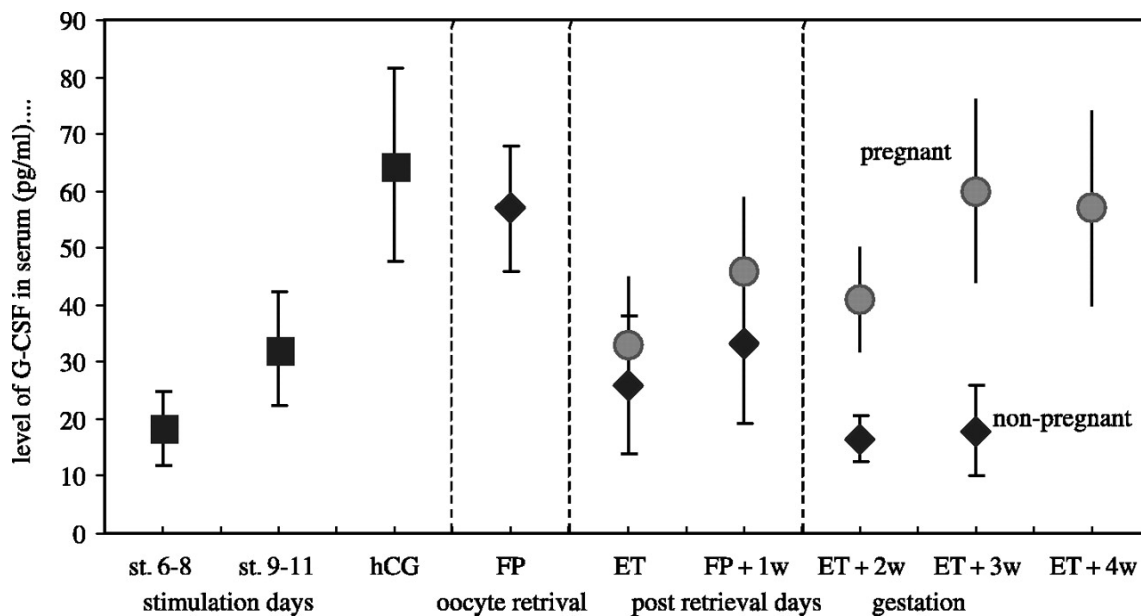


Figure 14 Evolution du taux de G-CSF sérique lors d'un cycle de stimulation ovarienne et après transfert embryonnaire. Le taux de G-CSF sérique augmente lors de la stimulation pour atteindre un pic au moment du déclenchement de l'ovulation, puis diminue dans les jours qui suivent la ponction ovocytaire. Le taux de G-CSF sérique augmente ensuite uniquement en cas d'implantation de l'embryon et de grossesse. Adapté de *Salmassi et al* [242].

4.3. G-CSF et implantation embryonnaire

Le G-CSF a été mis en évidence au niveau du FF lors d'un cycle spontané ou lors de la ponction ovarienne en FIV [245]. Le taux de G-CSF est significativement plus élevé dans le FF que dans le sérum au moment de la ponction ovocytaire, ce qui suggère une production intrafolliculaire du G-CSF [224, 242].

Le G-CSF folliculaire est un nouveau marqueur non invasif de qualité ovocytaire, qui peut améliorer la sélection embryonnaire en FIV, en cycle naturel ou stimulé [177, 249-252]. Le taux de G-CSF folliculaire est plus élevé dans un cycle stimulé que dans un cycle naturel [249]. Lédée et al ont réalisé des ponctions folliculaires individuelles et ont suivi le taux d'implantation de chaque embryon en fonction de la concentration de 28 cytokines/chémokines quantifiées par multiplex dans le FF dont cet embryon est issu. La technique de multiplex permet de quantifier simultanément plusieurs protéines dans un échantillon de faible volume, à l'aide de populations de microbilles magnétiques. Celles-ci présentent des spectres de fluorescence distincts et sont couplées à des anticorps de capture spécifiques de chaque protéine d'intérêt. Les protéines d'intérêt se lient aux microbilles, puis sont quantifiées grâce à l'ajout d'anticorps de détection liés à des fluorochromes. L'analyseur permet d'identifier les protéines d'intérêt et d'évaluer leur concentration par cytométrie de flux.

Grâce à cette technique, Lédée et al ont montré que la probabilité d'implantation de l'embryon est plus élevée quand le taux de G-CSF folliculaire augmente [250]. En effet, l'aire sous la courbe Receiver Operating Characteristic (ROC) est de 0,83 ($P=0,0001$), ce qui signifie que le taux de G-CSF folliculaire est plus élevé pour les embryons implantés dans 83% des cas (Figure 15). Le taux d'implantation

embryonnaire n'était pas associé à la concentration des 27 autres cytokines/chémokines quantifiées dans les FF.

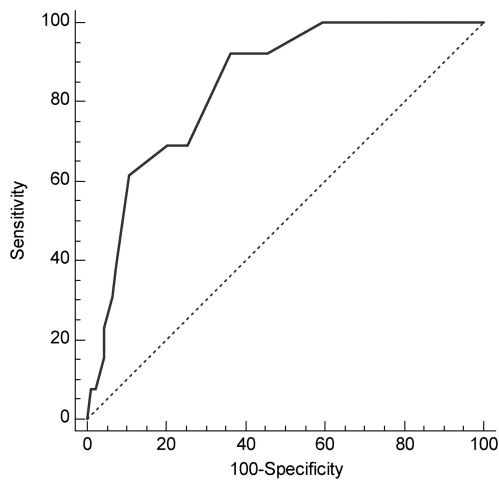


Figure 15 Courbe ROC montrant l'intérêt du G-CSF folliculaire comme facteur prédictif d'accouchement. Pour différentes valeurs de G-CSF folliculaire, la ligne continue montre le taux de vrai positif (sensibilité) en fonction du taux de faux positif (100-spécificité). L'aire sous cette courbe est de 0,83. La ligne pointillée représente une aire sous la courbe de 0,5, qui correspond à l'hypothèse nulle. Adapté de *Lédée et al* [250].

De plus, le taux de G-CSF folliculaire varie au sein de la cohorte d'embryons d'une même patiente et peut donc être utilisé pour identifier l'embryon au potentiel implantatoire le plus élevé au sein de cette cohorte (Figure 16) [250]. Enfin, le taux de G-CSF folliculaire est indépendant de la morphologie embryonnaire [177, 249, 250, 252] et peut être utilisé en association avec celle-ci pour déterminer l'embryon au plus haut potentiel implantatoire parmi la cohorte d'embryons d'une patiente.

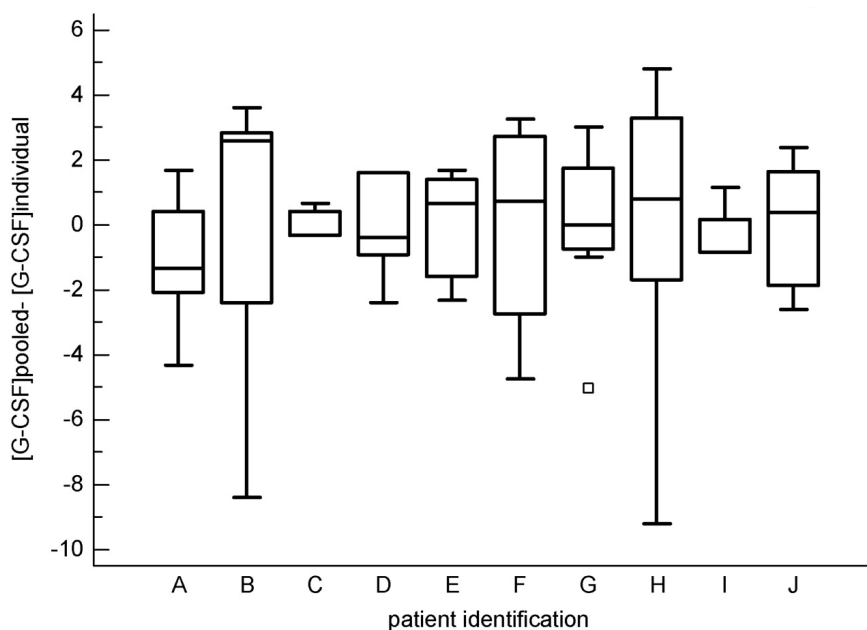


Figure 16 Variation du taux de G-CSF dans les FF collectés individuellement chez une même patiente. Chaque boîte illustre la variation de concentration du G-CSF dans un FF individuel, par rapport à la moyenne de l'ensemble des FF collectés chez une même patiente (n=10). Adapté de *Lédée et al* [250].

Suite à ces résultats, Lédée et al ont mené une étude de faisabilité dans le but d'évaluer l'intérêt de la quantification du G-CSF folliculaire pour identifier l'embryon au potentiel implantatoire le plus élevé au sein de la cohorte d'embryons d'une patiente [177]. Cette étude a déterminé la performance, la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives positive et négative (VPP et VPN) du G-CSF folliculaire et de la morphologie, seuls ou en combinaison, pour la sélection des embryons implantés. Le G-CSF folliculaire était un marqueur sensible (93%) avec une bonne VPN (97%) pour discriminer les embryons implantés, mais sa spécificité et sa VPP étaient faibles (54 et 28% respectivement). Ces 2 derniers paramètres pourraient être améliorés en combinant le G-CSF folliculaire et la morphologie, au prix d'une diminution de la sensibilité et de la VPN (Table 6).

Table 6 Puissance du G-CSF folliculaire, de la morphologie embryonnaire et d'une combinaison des deux paramètres pour la discrimination des embryons implantés. Adapté de Lédée et al [177].

	G-CSF folliculaire	Morphologie embryonnaire	Combinaison G-CSF + morphologie
Performance (AUC_{ROC})	0,77	0,66	0,76
P valeur	0,0001	0,009	0,0001
Sensibilité (%)	93	63	70
Spécificité (%)	54	64	77
Valeur prédictive positive (%)	28	26	38
Valeur prédictive négative (%)	97	90	93

Lédée et al ont ainsi déterminé 3 classes d'embryons en fonction du taux de G-CSF folliculaire correspondant. Ces 3 classes sont basées sur les 2 valeurs seuils de G-CSF folliculaire (18,4 et 30 pg/ml) ayant respectivement la VPN et la VPP les plus élevées pour le potentiel implantatoire de l'embryon. Les embryons de classe I issus des FF avec un taux de G-CSF > 30 pg/ml avaient une probabilité d'implantation significativement plus élevée que ceux des classes II (G-CSF entre 18,4 et 30 pg/ml) et III (G-CSF < 18,4 pg/ml). En combinant le taux de G-CSF folliculaire et la morphologie, les embryons de classe I et de morphologie A avaient un taux d'implantation significativement plus élevé que les autres catégories (Table 7).

Table 7 Taux d'implantation des embryons (n=195) en fonction du G-CSF folliculaire et de la morphologie. Adapté de Lédée et al [177].

G-CSF folliculaire (pg/ml)	Taux d'implantation (%)	Morphologie	Taux d'implantation (%)	G-CSF folliculaire et morphologie	Taux d'implantation (%)
I : > 30	36,4**	A	28*	IA	53,7**
				IB	28,5
				IC	16,6
II : 18,4-30	16,8	B	18	IIA	19,4
				IIB	16
				IIC	14
III : < 18,4	6	C	14	IIIA	6
				IIIB	8
				IIIC	5

* $P=0,01$: morphologie A par rapport à B et C ** $P<0,001$: classe I par rapport à II et III ; classe I et morphologie A par rapport à toutes les autres combinaisons des 2 facteurs

De façon rétrospective, Lédée et al ont comparé le taux d'implantation supposé si l'embryon avait été sélectionné selon une combinaison des 2 marqueurs (G-CSF folliculaire et morphologie) par rapport au taux d'implantation réellement obtenu lors de l'étude où la sélection était basée sur le critère morphologique seul. Chez 28% des patientes, l'embryon sélectionné pour le transfert frais n'était pas issu de la catégorie optimale selon la combinaison des 2 marqueurs, entraînant une diminution relative de 37,5% de grossesse.

Dans les études menées par Lédée et al, le taux de G-CSF folliculaire ne dépendait pas du protocole de stimulation ovarienne [177, 250]. Le G-CSF folliculaire diminue avec l'âge [250], mais est indépendant du nombre d'ovocytes ponctionnés [177, 253]. Il est diminué en cas d'hyperstimulation ovarienne [250, 252] et chez les patientes atteintes du SOMPK associé à un syndrome métabolique, pour lesquelles une altération du développement embryonnaire est décrite [254]. Il est également diminué chez les patientes atteintes d'endométriose, en association avec une baisse de la réserve ovarienne [242]. Le taux de G-CSF folliculaire serait positivement corrélé au nombre d'ovocytes fécondés après ICSI [253]. En résumé, le G-CSF folliculaire est diminué dans diverses conditions qui altèrent la fertilité comme la baisse de réserve ovarienne liée à l'âge, le SOMPK, l'endométriose, mais il est positivement corrélé au taux de fécondation après ICSI et à l'implantation embryonnaire. De plus, le taux de G-CSF folliculaire chez une même patiente est reproductible lors de 2 cycles de FIV successifs, suggérant qu'il pourrait être utilisé comme facteur pronostic [249].

Enfin, le taux de G-CSF sérique augmente lors de l'implantation de l'embryon en cas de grossesse spontanée [255] ou après FIV/ICSI [242] (Figure 14). Il a été montré que les cellules déciduales et endométriales de l'utérus, ainsi que les cellules trophoblastiques sécrètent du G-CSF [222, 223, 225, 256].

4.4. G-CSF et endomètre mince

En FIV, l'épaisseur endométriale est un des critères utilisés pour déterminer le moment optimal du transfert embryonnaire. Un endomètre mince est généralement défini comme ayant une épaisseur inférieure à 7 ou 8 mm le jour du déclenchement de l'ovulation pour les transferts d'embryon frais ou lors de l'initiation du traitement par progestérone pour les transferts d'embryon cryopréservé [257, 258]. L'incidence de cette pathologie est estimée entre 1,5 et 9% [257], mais elle est probablement sous-estimée, car la plupart des études n'incluent que les cycles qui ont conduit à un transfert d'embryon [258].

Dans leur méta-analyse publiée en 2014, Kasius et al ont montré que 2,4% des patientes suivies en FIV présentaient une épaisseur endométriale inférieure à 7 mm. En-dessous de ce seuil, le taux de grossesse clinique était significativement diminué (23 VS 48%), avec une tendance à une réduction du taux de naissance vivante. Cependant, l'épaisseur endométriale seule avait un pouvoir discriminatoire limité pour prédire les chances de grossesse [259]. En 2018, une large étude rétrospective canadienne a montré que les taux de grossesse clinique et de naissance vivante diminuent dès que l'épaisseur endométriale est inférieure à 8 mm pour les transferts d'embryon frais et à 7 mm pour les transferts d'embryon cryopréservé. Dans cette étude, une épaisseur endométriale

inférieure à 7 ou 8 mm a été mise en évidence dans 4 et 12% des transferts d'embryon frais, et dans 3 et 14% des transferts d'embryon cryopréserveré [257].

Divers traitements (oestradiol, aspirine, sildénafil, pentoxifylline, agoniste de la GnRH, vitamines C ou E, infusion de plasma enrichi en plaquettes, thérapie par cellules souches,...) ont été proposés en cas d'endomètre mince réfractaire, mais leur efficacité est incertaine [258, 260].

En 2011, Gleicher et al ont rapporté les cas cliniques de 4 patientes avec un endomètre mince réfractaire au traitement par oestradiol et vasodilatateur [261]. Une infusion intra-utérine de G-CSF a permis d'obtenir une épaisseur endométriale de 7 mm et une grossesse après transfert embryonnaire chez ces 4 patientes. Gleicher et al ont confirmé l'augmentation de l'épaisseur endométriale après perfusion intra-utérine de G-CSF le jour de l'induction de l'ovulation, et éventuellement le jour de la ponction ovocytaire, dans une cohorte de 21 patientes avec endomètre mince [262].

D'autres équipes ont utilisé la perfusion intra-utérine de G-CSF chez des patientes avec endomètre mince et ont obtenu des résultats variables. Certaines études ont confirmé l'augmentation de l'épaisseur endométriale suggérée par Gleicher et al [263-269], tandis que d'autres non [270-274]. Certaines études ont également montré une augmentation du taux d'implantation embryonnaire [268, 269] et de grossesse clinique [268], chez les patientes avec endomètre mince traitées par perfusion de G-CSF. Une méta-analyse de 11 études publiée en 2017 a montré que la perfusion intra-utérine de G-CSF était associée à une augmentation de l'épaisseur endométriale ainsi que des taux de grossesse et d'implantation embryonnaire, avec en parallèle une diminution du taux d'annulation de cycle pour endomètre trop mince [275]. Deux autres méta-analyses ont également montré une augmentation des taux de grossesse et d'implantation embryonnaire chez ces patientes [274, 276]. Globalement, les auteurs s'accordent sur la nécessité de mener des RCT incluant un nombre suffisant de patientes, ce qui est actuellement réalisé par l'équipe de Gleicher et al. Par ailleurs, deux RCT ont montré l'absence de bénéfice d'une infusion intra-utérine de G-CSF sur l'épaisseur endométriale et/ou le taux de grossesse chez des patientes non sélectionnées, c'est-à-dire avec une épaisseur endométriale normale [277, 278].

Chez l'animal, Zhao et al ont étudié l'impact d'un traitement sous-cutané par G-CSF dans un modèle expérimental de rats avec endomètre mince. Ils ont montré une augmentation de l'épaisseur endométriale chez les rats traités [279].

4.5. G-CSF et fausses couches à répétition

Une fausse couche correspond à l'arrêt spontané d'une grossesse avant la viabilité fœtale (généralement avant la 24^{ème} semaine de gestation) ; cette définition exclut les grossesses ectopiques et molaires, ainsi que les échecs d'implantation [280]. Le terme « fausses couches à répétition » est actuellement défini par les sociétés européenne (ESHRE) et américaine (ASRM) de médecine de la reproduction comme la survenue d'au moins 2 fausses couches. Cette pathologie affecte 1 à 2% des couples [280, 281]. Classiquement, ce terme était utilisé après la survenue de 3 fausses couches [282]. L'origine de cette pathologie reste souvent inexpliquée et les recommandations thérapeutiques sont limitées et de qualité modérée [280].

En 2009, une RCT menée par Scarpellini et al a étudié l'intérêt de l'administration quotidienne de G-CSF par voie sous-cutanée chez 68 patientes fertiles avec une histoire d'au moins 4 fausses couches consécutives inexplicées, sans naissance vivante. Le taux de naissance vivante dans le groupe traité par G-CSF était de 83% versus 48,5% dans le groupe contrôle ($P = 0,006$) [283]. Toutes les patientes ont soit accouché, soit subi une fausse couche dans les 3 mois suivant l'inclusion dans l'étude, ce qui correspond à un taux de fausse couche de 17% dans le groupe traité par G-CSF et de 51,5% dans le groupe contrôle. L'équipe de Wurfel et al a obtenu des résultats similaires avec 78% de naissances vivantes dans le groupe traité par G-CSF [221]. De façon intéressante, le taux de hCG sanguin était plus élevé chez les patientes traitées par G-CSF dans ces 2 études.

En 2013, Santjohanser et al ont publié les résultats d'une étude rétrospective portant sur 199 cycles de FIV/ICSI chez des couples infertiles avec une histoire d'au moins 2 fausses couches. Le taux de naissance vivante était de 32% dans le groupe traité par G-CSF en sous-cutané, de 13% dans le groupe non traité et de 14% dans un groupe recevant un autre traitement expérimental (cortisone, immunoglobulines intraveineuses ou héparine de bas poids moléculaire).

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent un intérêt du G-CSF dans la prise en charge des fausses couches à répétition, mais doivent être confirmés par des études multicentriques plus larges avant de pouvoir recommander ce traitement [280]. Un brevet américain a été déposé en 2009 pour le traitement par G-CSF en cas de fausses couches à répétition et d'échecs d'implantation répétés [277].

4.6. G-CSF et échecs d'implantation répétés

Un échec d'implantation peut se produire avant ou après la migration de l'embryon à travers l'endomètre et donc présenter ou non un dosage de hCG sanguin maternel positif ; le terme « grossesse biochimique » est utilisé en cas de dosage de hCG sanguin positif sans sac gestationnel visualisé à l'échographie. En pratique clinique, on parle d'implantation seulement quand un sac gestationnel est visible à l'échographie [284].

Le terme « échecs d'implantation répétés » ne s'utilise que pour les patientes suivies en FIV et, il n'y a actuellement pas de réel consensus sur sa définition. Parmi les définitions proposées, on retient l'absence de grossesse après transfert de ≥ 10 embryons de bonne qualité [285, 286]. D'autres parlent d'échecs d'implantation répétés après 3 cycles de FIV avec transferts d'embryons de bonne qualité [287-290], ou après transfert d'au moins 3 [291] ou 4 embryons de bonne qualité avant l'âge de 40 ans [284], sans succès.

En 2010, Wurfel et al ont mené une étude pilote évaluant l'administration sous-cutanée continue de G-CSF chez des patientes avec échecs d'implantation répétés [292]. Ils ont obtenu un taux de grossesse clinique par transfert de 74% dans cette population de mauvais pronostic, moyennant un taux de fausse couche de 39%. Cependant, ces résultats ne s'appliquent qu'aux patientes présentant un déficit en récepteur Killer-cell Immunoglobulin-like (KIR) de type activateur des cellules NK. En effet, le taux de grossesse par transfert était inférieur à 10% chez des patientes avec échecs d'implantation répétés ne présentant pas ce déficit. Ces récepteurs KIR sont exprimés

par les cellules NK utérines et sont impliqués dans le dialogue entre la mère et l'embryon qui permet l'implantation et la placentation [293].

Par la suite, plusieurs RCT et 1 méta-analyse ont évalué l'intérêt d'un traitement par G-CSF chez ces patientes avec échecs d'implantation répétés et ont montré une augmentation du taux de grossesse clinique dans le groupe traité [221, 240, 294-299]. Cependant, ces études diffèrent de par les critères utilisés pour définir les échecs d'implantation répétés, la voie d'administration du G-CSF sous-cutanée [221, 296-299] ou intra-utérine [294, 295, 299], le timing et la durée du traitement, ainsi que l'association à d'autres traitements éventuels.

4.7. G-CSF et protection ovarienne

Une étude a montré que le G-CSF en combinaison avec le VEGF protège les follicules primordiaux en cas de greffe ovarienne après congélation chez la souris [300]. Les mêmes auteurs ont évalué l'effet d'un traitement par G-CSF seul ou associé au Stem Cell Factor (SCF) pour la protection ovarienne avant chimiothérapie par alkylants dans un modèle murin. Le traitement par G-CSF avec ou sans SCF a montré un effet positif sur le nombre de follicules, la densité microvasculaire et la fertilité après chimiothérapie, avec extension du délai avant l'apparition d'une insuffisance ovarienne [301].

Un effet protecteur du G-CSF sur la réserve ovarienne a également été démontré chez le rat après induction expérimentale d'un diabète [302].

4.8. Sécurité d'emploi du G-CSF

En oncologie, les effets secondaires de l'utilisation du G-CSF en support d'une chimiothérapie sont mineurs ; il provoque principalement des douleurs osseuses [228]. Les recommandations établies par les sociétés d'oncologie ne montrent pas d'augmentation du risque de maladie lymphoproliférative, de progression tumorale ou d'induction d'une tumeur secondaire après traitement par G-CSF en support d'une chimiothérapie [303, 304].

Le G-CSF passe la barrière placentaire [305]. Les données sur l'utilisation du G-CSF pendant la grossesse proviennent soit de patientes cancéreuses qui ont reçu ce traitement pour prévenir une neutropénie ou pour mobiliser des cellules souches suite à une chimiothérapie [306], soit de patientes atteintes de neutropénie chronique [307-309]. Les données sont rassurantes et ne montrent pas d'effet embryotoxique ou tératogène du G-CSF, ni de majoration des complications obstétricales. Une revue récente de la littérature a conclu que le G-CSF pouvait être utilisé de façon sécuritaire pendant la grossesse [305].

Chez les patientes traitées par G-CSF pour fausses couches à répétition ou échecs d'implantation répétés, aucune malformation n'a été rapportée chez les nouveaux-nés [221, 283, 310], mais la sécurité d'emploi du G-CSF dans ces indications doit encore être démontrée par des études plus larges.

Buts et plan du travail

Dans les pays industrialisés, 15% des couples consultent pour une infertilité. En 1978, la première naissance après FIV a été obtenue par l'équipe de Robert G. Edwards. 40 ans plus tard, le succès de la FIV reste limité par l'implantation, qui nécessite un embryon de bonne qualité, un endomètre réceptif et un dialogue foeto-maternel correct [139]. Comme décrit précédemment, le choix de l'embryon à transférer est basé sur une évaluation morphologique, mais cette méthode reste subjective et il n'existe pas de paramètre morphologique capable de prédire avec certitude la qualité embryonnaire. Le taux d'implantation est de 25 à 35% pour un embryon au stade de clivage et de 40% pour un blastocyste chez des patientes de bon pronostic, c'est-à-dire âgées de moins de 38 ans ou donneuses d'ovocytes [311, 312]. L'évaluation de la qualité embryonnaire par la morphologie seule paraît donc insuffisante, au vu des taux d'implantation obtenus. Une technique de sélection embryonnaire optimale permettrait d'améliorer le succès de la FIV et de généraliser les transferts d'embryon unique, dans le but de limiter l'incidence des grossesses multiples.

Notre équipe a précédemment mis en évidence un nouveau marqueur prédictif de l'implantation embryonnaire, le G-CSF folliculaire. La quantification du G-CSF au niveau d'un FF individuel par la technologie de multiplex permet d'améliorer l'efficacité de la sélection embryonnaire, en association avec la morphologie [177]. Ainsi, le taux d'implantation embryonnaire est plus élevé quand l'ovocyte est issu d'un FF avec un taux de G-CSF élevé.

Ce travail a pour but d'étudier, d'une part, l'applicabilité de cette méthode de sélection embryonnaire en routine clinique et, d'autre part, la signification biologique du G-CSF en tant que marqueur de qualité ovocytaire. Il est divisé en 2 parties, l'une de recherche clinique et l'autre de recherche fondamentale.

Dans la première partie du travail, nous avons développé un ELISA ultra-sensible et spécifique permettant de doser le G-CSF folliculaire, en association avec un partenaire commercial. En effet, la technique de multiplex est validée pour des travaux de recherche, mais est trop onéreuse et techniquement trop délicate pour être utilisée en routine clinique. Notre équipe a précédemment démontré que les ELISA classiques n'étaient pas suffisamment sensibles et spécifiques pour mettre en évidence une corrélation entre la capacité implantatoire de l'embryon et le taux de G-CSF folliculaire [252]. Le pouvoir prédictif de ce nouvel ELISA ultra-sensible et spécifique a été testé dans une étude prospective observationnelle et multicentrique (**Article n°1**). De plus, une seconde étude observationnelle unicentrique a recherché une corrélation éventuelle entre le taux de G-CSF et le volume du follicule. Le volume des follicules ovariens est un des paramètres du suivi de la stimulation ovarienne en FIV, qui permet de déterminer le moment optimal du déclenchement de l'ovulation pour obtenir des ovocytes matures. L'intérêt du dosage du G-CSF folliculaire en clinique suppose qu'il soit un marqueur de qualité ovocytaire indépendant du volume du follicule (**Article n°2**).

Dans la deuxième partie du travail, nous avons étudié l'origine du G-CSF folliculaire et les mécanismes responsables de sa production au niveau du follicule pré-ovulatoire, grâce à deux modèles de culture cellulaire. L'un est basé sur l'isolement de cellules de granulosa à partir des FF collectés au moment de la ponction ovocytaire chez des patientes en cours de traitement par FIV, et l'autre sur des lignées de cellules de la

granulosa humaine. L'impact du cycle menstruel sur la production du G-CSF a également été évalué (**Article n°3**).

Résultats

Dans cette partie du manuscrit, les résultats sont présentés sous forme de 3 articles précédés d'un résumé comprenant une introduction, les principaux résultats et une discussion.

1. Développement et évaluation de la performance d'un ELISA ultra-sensible et spécifique du G-CSF folliculaire

Article n°1

« *Clinical performance of a specific granulocyte colony stimulating factor ELISA to determine its concentration in follicular fluid as a predictor of implantation success during in vitro fertilization.* »

H. Tournaye, T. D'Hooghe, G. Verheyen, K. F. Devreker, S. Perrier d'Hauterive, M. Nisolle, J.-M. Foidart, C. Munaut & **L. Noel.**

Gynecol Endocrinol, 2019: p. 1-5. DOI: 10.1080/09513590.2019.1631283

1.1. Introduction

Malgré des projets majeurs depuis les débuts de la FIV en 1978, une amélioration du taux de succès de la technique permettrait de favoriser les transferts d'embryon unique et, ainsi, de limiter les grossesses multiples et leurs complications spécifiques. En routine clinique, les cliniciens et les embryologistes se basent sur l'évaluation de la morphologie embryonnaire pour sélectionner l'embryon ayant le potentiel implantatoire le plus élevé, au sein de la cohorte d'embryons obtenus chez une patiente. Cependant, cette méthode d'évaluation est subjective et reste insuffisamment discriminante. En effet, si la plupart des patientes débutant un cycle de FIV bénéficient d'une ponction ovocytaire (90%) et d'un transfert d'embryon (67%), les taux de grossesse et d'accouchement par ponction n'atteignent qu'environ 30 et 20% [134]. L'implantation de l'embryon reste donc le facteur limitant le succès de la FIV.

Le G-CSF folliculaire est un nouveau marqueur de qualité ovocytaire capable de prédire l'implantation embryonnaire. La quantification du G-CSF au niveau d'un FF individuel par la technologie de multiplex permet d'améliorer l'efficacité de la sélection embryonnaire, en association avec la morphologie. Cependant, la technique de quantification du G-CSF doit être aisée pour être applicable en routine clinique. Les ELISA commerciaux classiques ne sont pas suffisamment sensibles pour reproduire les résultats obtenus par la technique de multiplex. C'est pour cette raison qu'un ELISA ultra-sensible et spécifique du G-CSF folliculaire a été développé. Les caractéristiques de cet ELISA sont présentées en annexe.

Le but de cette étude est d'évaluer la performance clinique de ce nouvel ELISA pour quantifier le G-CSF folliculaire et prédire la capacité implantatoire de l'embryon, en fonction de la concentration en G-CSF du FF individuel dont il est issu.

1.2. Résultats

Il s'agit d'une étude prospective, observationnelle, réalisée dans 10 centres de fertilité belges, suédois et danois entre août 2012 et janvier 2014. Les patientes traitées par FIV et âgées de 18 à 36 ans étaient éligibles si elles étaient bonnes répondeuses (6 à 16 follicules de diamètre ≥ 14 mm) et bénéficiaient d'un transfert d'embryon unique à J3 (ou J5). Des antécédents d'endométriase et/ou de chirurgie ovarienne et des taux de FSH élevés étaient des critères d'exclusion. Sur 465 femmes enrôlées dans l'étude, 278 ont rempli les critères d'inclusion et ont bénéficié de 396 transferts d'embryons uniques, dont 288 transferts frais à J3. Lors de la ponction ovocytaire, les FF ont été collectés individuellement en maintenant une traçabilité entre chaque ovocyte et le FF dont il était issu. Les FF ont été congelés pour être transportés dans un laboratoire central, où la quantification du G-CSF a été réalisée en triplicat à l'aide du nouvel ELISA ultrasensible et spécifique du G-CSF folliculaire. La concentration en G-CSF n'a pas été utilisée pour sélectionner l'embryon à transférer, puisqu'il s'agit d'une étude observationnelle. Les embryons ont été sélectionnés selon l'évaluation morphologique réalisée dans chaque centre de fertilité. Chaque embryon a reçu une gradation morphologique en catégorie A, B et C de façon rétrospective par un lecteur unique pour minimiser les biais. L'implantation embryonnaire a été évaluée à 12 semaines d'aménorrhée.

Sur les 288 embryons transférés à J3 dans les 10 centres de fertilité, 72,9% étaient de morphologie A pour 8,7 et 18,4% de morphologie B et C. A l'aide d'une courbe ROC, 3 catégories ont été définies en fonction du seuil de concentration en G-CSF ayant la VPN la plus élevée (17,5 pg/ml) et la VPP la plus élevée (48 pg/ml) pour prédire l'implantation. Le taux d'implantation n'était pas significativement différent entre ces 3 catégories, mais les embryons issus d'un FF avec un taux de G-CSF > 48 pg/ml avaient un taux d'implantation de 32,3%, c'est-à-dire 1,17 fois plus élevé que l'ensemble des embryons (27,5%) et 2,11 fois plus élevé que les embryons avec un taux de G-CSF folliculaire $< 17,5$ pg/ml (15,3%). De même, pour les embryons de morphologie A, la probabilité d'implantation avec un taux de G-CSF folliculaire > 48 pg/ml (34,5%) était 1,15 fois plus élevée que celle de l'ensemble des embryons A (30%) et 1,76 fois plus élevée que celle des embryons A avec un taux de G-CSF folliculaire $< 17,5$ pg/ml (19,6%).

La probabilité d'implantation a également été calculée pour le centre ayant réalisé le plus de transferts frais d'embryon unique à J3 (n=114). Les résultats étaient similaires, mais les différences entre les catégories de G-CSF étaient plus prononcées, même si elles restaient non significatives. Ainsi, la probabilité d'implantation avec un taux de G-CSF folliculaire $> 48,7$ pg/ml (35,0%) était 1,53 fois plus élevée que celle de l'ensemble des embryons (22,9%) et 3,27 fois plus élevée que celle des embryons avec un taux de G-CSF folliculaire $< 17,3$ pg/ml (10,7%).

Enfin, le taux de G-CSF folliculaire était plus élevé pour les embryons implantés, qu'il s'agisse d'un transfert frais ou congelé à J3 ou J5, même si la différence n'était pas significative.

1.3. Discussion

Même si cette étude n'a pas montré de différence significative entre la probabilité d'implantation embryonnaire dans les 3 catégories de G-CSF folliculaire, elle suggère une association entre le taux de G-CSF folliculaire et la capacité implantatoire de l'embryon correspondant. En effet, le taux d'implantation est systématiquement augmenté pour les catégories d'embryons avec un taux de G-CSF folliculaire élevé. De plus, le taux de G-CSF folliculaire est plus élevé pour les embryons implantés, qu'il s'agisse d'un transfert frais ou congelé, à J3 ou à J5.

Cette absence de différence significative entre les catégories de G-CSF peut s'expliquer par la variabilité des techniques de ponction ovocytaire utilisée dans les 10 centres de fertilité. En effet, chaque centre était autorisé à utiliser sa technique de ponction habituelle. Des différences dans le type d'aiguille utilisée pour la ponction, la longueur du tuyau d'aspiration et la réalisation ou non d'un flushing consistant à injecter puis réaspirer du milieu dans le follicule ponctionné, entraînent une variabilité de dilution du FF. Cela est responsable d'une différence de concentration moyenne en G-CSF entre les 10 centres. L'analyse unicentrique a montré que les différences entre les catégories de G-CSF étaient plus prononcées si les données d'un seul centre étaient prises en compte. Cependant, la puissance statistique de l'étude a été calculée pour l'ensemble des transferts réalisés dans les 10 centres.

2. Evaluation d'une corrélation entre le taux de G-CSF folliculaire mesuré par un ELISA ultra-sensible et le volume du follicule

Article n°2

« *Absence of correlation between follicular fluid volume and follicular granulocyte colony-stimulating factor, a predictor of embryo implantation and successful delivery.* »

L. Noël, A-F. Donneau, C. Jouan, S. Schoenen, N. Lédée, J-M. Foidart, M. Nisolle & C. Munaut

Gynecol Endocrinol, 2019; p. 1-5. DOI:10.1080/09513590.2019.1650341

2.1. Introduction

Le succès de la FIV reste limité par l'implantation embryonnaire. En effet, seuls 5% des ovocytes ponctionnés et environ 25% des embryons transférés donnent naissance à un bébé vivant. La sélection embryonnaire est basée sur le développement et la morphologie de l'embryon, mais les méthodes de gradation morphologique varient entre les centres de fertilité et entre les observateurs. L'introduction de nouvelles méthodes de sélection embryonnaire permettrait d'améliorer le taux de succès de la FIV, mais aussi de diminuer l'incidence des fausses couches et des grossesses multiples.

Le G-CSF folliculaire est un nouveau marqueur non invasif de qualité ovocytaire qui peut être utilisé pour prédire l'implantation embryonnaire. Il est indépendant de la morphologie embryonnaire et peut donc être utilisé en combinaison avec celle-ci pour améliorer la sélection embryonnaire.

Lors de la stimulation ovarienne en FIV, le déclenchement de l'ovulation est programmé dans le but d'obtenir des ovocytes matures. Un des critères utilisés pour déterminer le moment d'induction de l'ovulation est la taille des follicules.

L'objectif primaire de cette étude est de rechercher une corrélation éventuelle entre le volume du FF et le taux de G-CSF folliculaire. En effet, le dosage du G-CSF folliculaire perd son intérêt s'il peut être remplacé par le suivi de la croissance folliculaire à l'échographie. Les objectifs secondaires sont d'évaluer la relation entre le taux de G-CSF folliculaire et, d'une part, la maturité ovocytaire et, d'autre part, le taux d'implantation et de naissance vivante.

2.2. Résultats

Il s'agit d'une étude observationnelle unicentrique, réalisée dans le centre de procréation médicalement assistée de l'Université de Liège entre novembre 2015 et mars 2016. 32 patientes débutant un traitement par ICSI ont été enrôlées dans l'étude et 307 FF ont été ponctionnés, dont 213 de façon individuelle. Le volume de chaque FF a été évalué et le G-CSF a été quantifié par un ELISA ultra-sensible et spécifique du G-CSF

folliculaire. Les embryons ont été cultivés de manière individuelle jusqu'à J3, en maintenant une traçabilité entre chaque embryon et le FF dont il est issu.

Le devenir des embryons de chaque patiente a été suivi jusqu'à ce que la patiente ait accouché d'un bébé vivant ou ait utilisé tous les embryons issus du cycle d'ICSI étudié. 31 patientes ont bénéficié d'un transfert d'embryon(s) frais et 7 grossesses singleton ont été obtenues. Parmi les 24 patientes qui n'étaient pas enceintes après ce transfert frais, 23 ont bénéficié d'un ou plusieurs transfert(s) d'embryon(s) congelé(s). Ainsi, 46 transferts d'embryon(s) congelé(s) ont permis d'obtenir 8 grossesses singleton et 2 grossesses gémellaires. Le taux de grossesse cumulé est donc de 53,1%.

Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le volume du FF et le taux de G-CSF (n=211 ; Spearman $r = -0.021$; $P=0,38$). La concentration médiane en G-CSF folliculaire était de 51,3 pg/ml pour les embryons ayant donné un bébé vivant (n=15), de 49,7 pg/ml pour les embryons non implantés (n=44) et de 42,7 pg/ml pour les embryons associés à une fausse couche (n=10). Le taux de G-CSF folliculaire n'était pas associé à la maturité ovocytaire, évaluée par l'expulsion du 1^{er} globule polaire (n=211). Enfin, la probabilité d'implantation était significativement plus élevée pour les embryons issus d'un FF avec un taux de G-CSF > 67,2 pg/ml (66,7%), que pour ceux issus d'un FF avec un taux de G-CSF compris entre 44,7 et 67,2 pg/ml (19,4%) ou $\leq 44,7$ pg/ml (14,8%) (n=69 ; $P=0,03$). La probabilité d'implantation globale était de 21,7%.

2.3. Discussion

Plusieurs études ont démontré que le G-CSF folliculaire était un biomarqueur prédictif de l'implantation embryonnaire. Ce biomarqueur est indépendant de la morphologie embryonnaire et du nombre d'ovocytes ponctionnés. Par contre, le taux de G-CSF folliculaire diminue avec l'âge de la patiente, en cas de syndrome des ovaires micropolykystiques associé à un syndrome métabolique ou en cas d'endométriose avec une réserve ovarienne basse. Toutes ces conditions sont associées à un moins bon pronostic en FIV.

Cette étude montre que le G-CSF folliculaire est également indépendant du volume du follicule, évalué par la mesure du volume du FF. L'évaluation du diamètre des follicules par échographie en 2 dimensions est un des paramètres utilisés pour monitorer la réponse à la stimulation ovarienne et déterminer le moment du déclenchement de l'ovulation. En effet, la maturation du follicule est associée à sa croissance. L'échographie en 2 dimensions permet d'évaluer le diamètre des follicules, mais pas leur volume, étant donné qu'ils ne sont pas strictement sphériques. Puisque le taux de G-CSF folliculaire est indépendant du volume du follicule, ce paramètre ne peut pas se substituer à la quantification du G-CSF pour prédire le taux d'implantation de l'embryon. L'équipe de Wirleitner a également montré que le volume du follicule évalué par la mesure du volume du FF ou par échographie en 3 dimensions n'était pas associé au taux d'implantation embryonnaire.

Cette étude a également montré que le taux de G-CSF folliculaire n'était pas associé à la maturité ovocytaire, évaluée par l'observation du stade de la méiose (vésicule germinale, ovocyte en métaphase I ou II). Ces résultats confirment ceux obtenus par Wirleitner et al sur une plus petite série. De plus, cette étude confirme

l'intérêt du G-CSF mesuré par un ELISA spécifique pour prédire le potentiel implantatoire de l'embryon. Enfin, elle suggère une tendance à un taux de G-CSF folliculaire abaissé en cas de fausse couche.

3. Recherche de l'origine du G-CSF folliculaire et des mécanismes responsables de sa production au niveau du follicule pré-ovulatoire

Article n°3

« *A paracrine interaction between granulosa cells and leukocytes in the preovulatory follicle causes the increase in follicular G-CSF levels.* »

L. Noël, M. Fransolet, N. Jacobs, J-M. Foidart, M. Nisolle, C. Munaut.

Article accepté pour publication dans le JARG le 7 janvier 2020

3.1. Introduction

Le G-CSF folliculaire est un nouveau biomarqueur de qualité ovocytaire en FIV. Cependant, son rôle dans la physiologie de la reproduction reste méconnu.

En 1980, Espey a comparé l'ovulation à une réaction inflammatoire contrôlée. En effet, le pic de LH induit un état inflammatoire au niveau du follicule pré-ovulatoire, avec hyperémie, accumulation de cytokines/chémokines et de leucocytes (neutrophiles et macrophages), et remodelage du tissu conjonctif. Le G-CSF est produit par les cellules stromales de la moëlle osseuse et est la principale cytokine qui stimule la production, la différenciation et la fonction des granulocytes. Il est également produit par les leucocytes (monocytes/macrophages, cellules NK, lymphocytes T et cellules dendritiques) et par différentes cellules du système reproducteur, dont les cellules de la granulosa.

Le taux de G-CSF sérique présente un pic au moment de l'ovulation spontanée ou induite en FIV, et sa concentration est plus élevée au niveau du FF que du sang périphérique au moment de la ponction ovocytaire. De plus, l'expression de l'ARNm du G-CSF au niveau des cellules de la granulosa est dix fois plus élevée en phase folliculaire tardive, juste avant l'ovulation. Ces données suggèrent un rôle du G-CSF dans le mécanisme de l'ovulation.

Le rôle du G-CSF dans la maturation de l'ovocyte et l'ovulation n'est pas élucidé. Le but de cette étude est d'évaluer les cellules et les mécanismes responsables de la production du G-CSF au niveau du follicule pré-ovulatoire, et en particulier, l'interaction entre les cellules de la granulosa et les leucocytes.

3.2. Résultats

Il s'agit d'une étude fondamentale réalisée dans le centre de procréation médicalement assistée de l'Université de Liège. Des cellules de granulosa humaines lutéinisées (hGC) et des leucocytes ont été isolés à partir du FF de 41 patientes traitées par FIV. Des prélèvements sanguins ont également été réalisés chez 14 de ces patientes pour isoler des leucocytes à partir du sang périphérique. De plus, des prélèvements sanguins ont été réalisés chez 3 femmes témoins avec des cycles menstruels réguliers et

ovulatoires, dans le but d'isoler des leucocytes à différentes phases du cycle. Une lignée de cellules de granulosa humaine (HGL5) a également été utilisée comme modèle. Des cocultures de cellules de la granulosa de type hGC ou HGL5 et de leucocytes folliculaires ou sanguins ont été réalisées pour quantifier la production de G-CSF dans le milieu de culture.

La production de G-CSF était significativement majorée en cas de coculture de cellules de la granulosa avec des leucocytes. Ceux-ci induisaient la production de G-CSF par les cellules de la granulosa. Cet effet était maximal quand les leucocytes étaient isolés à partir du FF par rapport au sang périphérique des patientes traitées par FIV, ou à partir du sang périphérique des femmes témoins en fin de phase folliculaire par rapport aux autres phases du cycle menstruel. La population de leucocytes isolée à partir du FF de patientes traitées par FIV contenait une proportion augmentée de granulocytes par rapport au sang périphérique correspondant. La sécrétion de G-CSF était également majorée, mais de façon moindre, quand les contacts cellulaires étaient empêchés par l'utilisation d'un insert dans les cocultures. Enfin, parmi un échantillon de cytokines et chémokines testées dans les milieux de coculture, seuls le G-CSF et le GRO α étaient majorés de façon significative dans les 2 modèles (hGC et HGL5).

3.3. Discussion

Cette étude a montré que l'augmentation du G-CSF folliculaire au moment de l'ovulation coïncide avec une accumulation de granulocytes au niveau du FF. Ces leucocytes stimulent la production de G-CSF par les cellules de la granulosa. Nos résultats confirment donc une accumulation de granulocytes au niveau des follicules pré-ovulatoires. De plus, les neutrophiles constituent la majorité des granulocytes, et leur rôle dans l'ovulation a été démontré chez l'animal ; une déplétion en neutrophiles entraîne une diminution du taux d'ovulation chez le rat et le lapin.

Le rôle du G-CSF dans l'ovulation avait déjà été suggéré par Makinoda [247]. Le G-CSF participerait au recrutement des leucocytes au niveau du follicule pré-ovulatoire, ce qui favoriserait l'ovulation via la production de cytokines/chémokines et d'enzymes protéolytiques.

Dans notre étude, seules les productions de G-CSF et de GRO α étaient majorées dans les 2 modèles de coculture (HGL5 et hGC). GRO α est également produit par les cellules de la granulosa et les leucocytes, et sa concentration est plus importante dans le FF que dans le sang. GRO α est un agent chémoattractant pour les neutrophiles. Ainsi, G-CSF et GRO α pourraient participer à l'accumulation de neutrophiles au niveau du follicule pré-ovulatoire.

En conclusion, des taux élevés de G-CSF folliculaire pourraient être observés dans les follicules où l'interaction paracrine entre les cellules de la granulosa et les leucocytes est optimale. Cela pourrait contribuer à la maturation folliculaire et expliquer le taux d'implantation majoré des embryons issus des FF avec un taux de G-CSF élevé.

Discussion

Quarante ans après la première naissance obtenue par FIV, la technique a connu des avancées fondamentales, mais son succès reste limité par l'implantation de l'embryon [139]. En effet, les dernières statistiques belges et européennes montrent que, si la plupart des patientes débutant un cycle de FIV bénéficient d'une ponction ovocytaire (90%) et d'un transfert d'embryon (67%), les taux de grossesse et d'accouchement par ponction ne dépassent pas respectivement 30 et 20% [131, 134]. Ainsi, le taux d'implantation est d'environ 25 à 35% pour un embryon au stade de clivage et de 40% pour un blastocyste [311, 312]. Le rendement est encore plus faible si l'on considère l'ensemble des ovocytes ponctionnés, puisque seuls 30% de ceux-ci donnent un embryon et 5% un bébé né vivant [137, 149].

L'implantation dépend de l'interaction entre un embryon de bonne qualité et un endomètre réceptif. Ce travail s'intéresse à l'évaluation de la qualité ovocytaire et embryonnaire par la quantification du G-CSF folliculaire. Le G-CSF pourrait également être impliqué dans la réceptivité endométriale, puisque des études cliniques ont montré son intérêt thérapeutique chez des patientes souffrant d'échecs d'implantation répétés ou de fausses couches à répétition.

L'implémentation de nouveaux marqueurs de qualité embryonnaire ou ovocytaire, comme le G-CSF, a pour objectif général d'améliorer l'efficacité de la sélection embryonnaire. Cela sous-entend que l'on obtienne plusieurs embryons par cycle de FIV. La sélection perd évidemment de son intérêt chez les patientes qui n'obtiennent qu'un embryon à l'issue d'un cycle. Une sélection plus efficace permettrait d'améliorer le taux de naissance vivante à l'issue du premier transfert. D'une part, le nombre de transferts (et donc le délai) nécessaires avant d'obtenir une grossesse serait diminué. D'autre part, les transferts d'embryon unique pourraient être privilégiés, sans impacter significativement le taux de naissance vivante, dans le but de réduire le taux de grossesses multiples et les complications qui y sont associées. Enfin, le taux de fausse couche pourrait également être diminué. Cependant, le taux de grossesse cumulé par cycle de FIV ne devrait pas être augmenté, puisque la sélection ne permet pas d'améliorer la qualité des embryons disponibles. Elle permet de transférer en priorité l'embryon qui donne une probabilité maximale de grossesse [313].

Cette discussion va, d'une part, comparer le G-CSF folliculaire aux autres méthodes de sélection embryonnaire, et d'autre part, aborder les hypothèses évoquées pour expliquer le rôle du G-CSF comme marqueur de qualité ovocytaire et plus généralement comme outil thérapeutique dans la prise en charge de l'infertilité.

1. Méthodes de sélection embryonnaire

A l'heure actuelle, l'analyse morphologique séquentielle de l'embryon au stade de clivage ou de blastocyste reste le gold standard pour la sélection embryonnaire en FIV. Cette méthode reste cependant subjective, avec des gradations morphologiques qui varient en fonction des centres de fertilité [140, 141], même si, depuis 2011, l'ESHRE a proposé une terminologie commune pour l'évaluation morphologique des embryons [141]. De la même manière, l'utilisation d'algorithmes de sélection avec la technique de « time-lapse imaging » a pour but de standardiser l'évaluation de la morphologie embryonnaire. A la différence de l'évaluation morphologique, les nouveaux marqueurs

de qualité ovocytaire et embryonnaire se veulent non subjectifs, puisqu'ils reposent sur des techniques de quantification d'ARN, de protéines, de métabolites,... ou sur la recherche d'aneuploïdies chez l'embryon.

Ces nouvelles techniques de sélection nécessitent une culture individuelle pour maintenir une traçabilité entre chaque embryon et les résultats de son test de qualité, qu'il soit réalisé au niveau des cellules de la granulosa/du cumulus oophorus, du FF ou du milieu de culture. De la même manière, après la biopsie de cellules embryonnaires, chaque embryon doit être cultivé séparément pour être associé à ses résultats génétiques.

L'analyse de marqueurs de qualité ovocytaire ou embryonnaire au niveau des cellules de la granulosa et du cumulus oophorus, du FF et du milieu de culture de l'embryon, ainsi que la technologie de « time-lapse imaging », ont l'avantage d'être non invasives. En effet, elles ne nécessitent pas de prélever des cellules embryonnaires, à la différence du diagnostic génétique préimplantatoire des aneuploïdies (PGT-A). Un effet délétère potentiel de cette biopsie limite la généralisation de cette technique. Il semble admis que la biopsie réalisée au niveau du trophoctoderme d'un blastocyste est préférable à la biopsie de blastomère(s) d'un embryon au stade de clivage [203]. En effet, la biopsie du trophoctoderme n'emporte pas de cellules à devenir fœtal et représente un plus faible pourcentage de l'embryon, même si le trophoctoderme est important pour l'implantation [201]. Au stade de clivage, la biopsie d'un seul blastomère serait moins délétère [314]. Les données sur le devenir obstétrical et néonatal des enfants issus d'embryons biopsiés dans le but de réaliser un diagnostic génétique préimplantatoire sont rassurantes, même si la majorité des données proviennent de couples fertiles, chez qui cette technique a été réalisée pour éviter la transmission de maladies héréditaires monogéniques (PGT-M) [201]. Une alternative à la biopsie de cellules embryonnaires est la réalisation du PGT-A sur les globules polaires. Cette technique ne serait pas délétère pour le développement de l'embryon [206], mais elle présente deux désavantages. D'une part, elle ne permet d'identifier que les aneuploïdies d'origine maternelle, avec une bonne concordance avec l'analyse des chromosomes de l'ovocyte. D'autre part, elle nécessite l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons, puisque le nombre d'ovocytes, et donc de globules polaires qui y sont associés, est généralement plus élevé que le nombre d'embryons [204]. Certains ont également proposé une alternative moins invasive utilisant de l'ADN obtenu à partir du fluide blastocélique, ou une alternative non invasive utilisant de l'ADN obtenu à partir du milieu de culture de l'embryon [194]. Cependant, la biopsie du trophoctoderme du blastocyste est la technique la plus étudiée et la plus développée à l'heure actuelle [206].

Une autre limite à la généralisation du PGT-A est la crainte d'éliminer des embryons qui auraient pu donner un enfant en bonne santé. Si les biomarqueurs non invasifs ont pour objectif de classer les embryons de la cohorte d'une patiente en fonction de leur potentiel implantatoire, le PGT-A a pour but de sélectionner les embryons euploïdes, et par conséquent, d'éliminer les embryons aneuploïdes. Un faux diagnostic d'aneuploïdie est donc fortement préjudiciable et pourrait entraîner une diminution du taux de grossesse cumulé par cycle [313]. Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour analyser les chromosomes de l'embryon. Aucune étude n'a réellement démontré la supériorité d'une technique par rapport à l'autre, hormis pour la FISH combinée avec une biopsie de l'embryon au stade de clivage [202]. Plusieurs RCT ont

démonstré que cette stratégie n'améliorait pas, voire diminuait, le taux de grossesse [202]. Cela a été expliqué par l'effet délétère de la biopsie sur l'embryon à J3 et par l'absence de détection de l'ensemble des aneuploïdies par la technique de FISH, qui ne permet d'étudier que certains chromosomes [206].

De plus, le mosaïcisme complique l'évaluation de la qualité embryonnaire. On parle de mosaïcisme quand 2 (voire plusieurs) populations cellulaires avec des caryotypes différents coexistent au sein d'un même embryon, suite à des erreurs lors de la ségrégation des chromosomes. Le mosaïcisme est dû à des erreurs lors des mitoses qui suivent la fécondation, et à la différence des aneuploïdies d'origine méiotique, sa fréquence n'est pas augmentée par l'âge maternel [315]. Par contre, le mosaïcisme est plus fréquent chez l'embryon au stade de clivage, où il peut survenir dans environ 30% des cas, et la biopsie d'un ou deux blastomère(s) peut ne pas être représentative du statut chromosomique de l'embryon [316]. Comme le mosaïcisme est moins fréquent chez le blastocyste et que la biopsie à J5 permet d'obtenir plus de cellules, cette technique est plus efficace pour détecter les embryons mosaïques. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) est également plus sensible que les autres techniques (CGH-array, qPCR,...) pour détecter les embryons mosaïques, qui pourraient représenter 20% des blastocystes [317]. L'utilisation de techniques dont la sensibilité est suboptimale pour la détection des embryons mosaïques pourrait avoir un impact clinique défavorable. En effet, les embryons mosaïques pourraient être classés comme normaux avec un risque d'aneuploïdie pendant la grossesse, ou être classés comme uniformément aneuploïdes et être éliminés. Il a été démontré que les embryons mosaïques peuvent s'implanter et donner naissance à un individu en bonne santé [201], même si le taux d'implantation est abaissé et le taux de fausse couche augmenté avec ce type d'embryon. Les embryons mosaïques représentent donc une catégorie intermédiaire ; les embryons euploïdes doivent être sélectionnés en priorité, mais les embryons mosaïques peuvent représenter un deuxième choix, après discussion avec le couple. On ne sait pas actuellement si la présence d'un mosaïcisme lors du PGT-A est associée à une fréquence accrue d'anomalies congénitales [317]. Enfin, le type d'embryon mosaïque pourrait influencer le pronostic, en fonction du pourcentage de cellules embryonnaires anormales, et de la complexité de la mosaïque en terme de nombre de lignées cellulaires différentes [317].

Avant d'être utilisé en routine clinique, un nouveau test de qualité embryonnaire doit prouver sa performance [318]. Ses paramètres (sensibilité, spécificité, VPP, VPN,...) doivent être validés dans une étude clinique appropriée. Ces analyses ont été réalisées pour le dosage du G-CSF folliculaire par la technique de multiplex [177], ainsi que pour certains autres biomarqueurs [133, 148, 157, 319-321]. Notre équipe a également démontré que les ELISA commerciaux n'étaient pas suffisamment sensibles pour prédire le potentiel implantaire de l'embryon en fonction du G-CSF folliculaire [252]. Cela a été confirmé par deux autres équipes : le taux de G-CSF folliculaire était prédictif du taux de grossesse quand il était quantifié par le multiplex [253], et non par un ELISA commercial [322]. Notre équipe a bénéficié d'un ELISA ultra-sensible et spécifique du G-CSF folliculaire, dont les résultats sont comparables à ceux obtenus par le multiplex [323]. Par rapport au multiplex, cet ELISA ne nécessite pas de plateforme technique complexe et est moins coûteux. Ces 2 avantages le rendent plus adapté à une utilisation en routine clinique.

Ensuite, des RCT doivent évaluer l'intérêt du test, seul ou en combinaison avec l'analyse morphologique de l'embryon [318]. Aucun nouveau marqueur de sélection embryonnaire n'a encore franchi toutes ces étapes.

Seuls le « time-lapse imaging », l'analyse du métabolisme embryonnaire au niveau du milieu de culture et le PGT-A ont été évalués dans des RCT. Une étude prospective interventionnelle sur l'analyse de gènes du cumulus oophorus vient d'être publiée, mais il ne s'agit pas d'une RCT. En ce qui concerne le dosage du G-CSF folliculaire, l'étude DESTINY est en cours ; il s'agit d'une RCT ayant pour objectif de comparer le taux d'implantation des embryons sélectionnés par la morphologie et le taux de G-CSF folliculaire quantifié par ELISA, à celui des embryons sélectionnés par la morphologie seule, dans le cadre d'un transfert d'embryon unique à J3.

La technique de « time-lapse imaging » a été évaluée dans plusieurs RCT avec des résultats variables. En 2018, une méta-analyse de la Cochrane a évalué 8 études réparties en 3 catégories :

1. comparaison entre le « time-lapse » sans programme de sélection embryonnaire, c'est-à-dire avec analyse d'images statiques par les biologistes, et l'évaluation morphologique séquentielle. Ici, l'analyse morphologique est identique dans les 2 groupes et le but est d'évaluer l'intérêt des conditions de culture stables du « time-lapse »
2. comparaison entre le « time-lapse » avec et sans programme de sélection embryonnaire. Ici, les conditions de culture sont identiques dans les 2 groupes et le but est d'évaluer l'intérêt du programme de sélection embryonnaire du « time-lapse »
3. comparaison entre le « time-lapse » avec programme de sélection embryonnaire et l'évaluation morphologique séquentielle. Le but de cette catégorie d'études est d'évaluer simultanément les conditions de culture stables et le programme de sélection embryonnaire du « time-lapse ». Seule cette catégorie a montré une augmentation du taux de naissance, mais avec un très faible niveau de preuve et un risque élevé de biais.

La méta-analyse conclut que le bénéfice du « time-lapse » en terme d'amélioration du taux de grossesse clinique et de naissance vivante, ou de diminution des fausses couches, n'est pas démontré. Les patientes doivent être informées de l'absence de preuve d'une supériorité du « time-lapse » par rapport à l'évaluation morphologique classique [146].

Comme décrit précédemment, trois RCT ont évalué l'intérêt de la sélection embryonnaire par l'analyse du métabolome de l'embryon au niveau du milieu de culture grâce à un outil commercial, en association avec la morphologie [183-185]. Cet outil a été retiré du marché suite aux résultats décevants de ces études, qui n'ont pas montré d'amélioration du taux de grossesse clinique ou de naissance vivante. Cela a été attribué à un manque de reproductibilité de l'outil commercial, qui avait pourtant obtenu des résultats encourageants dans des études rétrospectives.

Six RCT ont évalué l'intérêt du PGT-A par analyse de l'ensemble des chromosomes (CCS) en association avec la morphologie (groupe traité), par rapport à la sélection embryonnaire classique par la morphologie seule (groupe contrôle). Dans quatre de ces études, la biopsie a été réalisée au niveau du trophoctoderme du blastocyste [133, 208, 210, 211], alors que la biopsie d'un blastomère de l'embryon au stade clivage [209] ou la

biopsie des globules polaires [206] ont été utilisées dans les deux autres études. Le taux d'aneuploïdies était de 30 à 54% pour l'embryon à J5, de 79% à J3 et de 65% pour les globules polaires sur une population de patientes de plus de 35 ans. La technique de génomique utilisée était également variable : trois études ont utilisé le CGH-array [206, 209, 210], la qPCR a été utilisée dans deux études réalisées par la même équipe [133, 208], et le NGS a été utilisé dans l'étude la plus récente [211]. En effet, le NGS est considéré comme la technique de pointe, notamment grâce à sa plus grande sensibilité pour la détection des embryons mosaïques [191, 315]. Les trois premières études publiées sont unicentriques [133, 208, 210], alors que les trois dernières sont multicentriques [206, 209, 211]. La population étudiée varie également entre ces études : l'une a inclus des patientes de moins de 35 ans [210], trois ont inclus des patientes qui avaient 2 blastocystes de qualité suffisante pour être biopsiés à J6 [133, 208, 211], et deux des patientes de plus de 35 ans [206, 209]. Globalement, toutes ces études ont exclu les patientes avec une réserve ovarienne basse. Les embryons ont été transférés au stade de blastocyste à J5 ou J6, sauf dans l'étude ayant utilisé la biopsie des globules polaires où certains embryons ont été transférés à J3 [206].

Deux études unicentriques ont montré une augmentation du taux de grossesse clinique évolutive [210] et du taux d'implantation évolutive [133] après transfert frais d'un [210] ou deux [133] blastocyste(s) euploïde(s) à J6, par rapport au transfert frais d'un [210] ou deux [133] blastocyste(s) sélectionné(s) par la morphologie seule. Une autre étude unicentrique a comparé les taux de grossesse clinique évolutive et de grossesse multiple après transfert frais ou cryopréservé d'un blastocyste euploïde, par rapport à deux blastocystes sélectionnés par la morphologie seule. Le taux de grossesse clinique était identique dans les deux groupes, mais le taux de grossesse multiple était de 53% dans le groupe contrôle versus 0% dans le groupe traité [208]. Ces trois études ont utilisé la biopsie du trophoctoderme à J5.

Dans les deux études multicentriques réalisées sur des patientes de plus de 35 ans, le taux de naissance vivante par patiente était augmenté après un premier transfert d'embryon(s) euploïde(s) [209], bien que de façon non significative dans l'une des études [206]. Un peu plus de 30% des patientes n'avaient pas d'embryon euploïde et n'ont donc pas eu de transfert dans le groupe traité. Dans ces deux études, le nombre de transferts pour obtenir une naissance vivante, le taux de fausse couche et le nombre d'embryons cryopréservés étaient diminués dans le groupe traité par rapport au groupe contrôle. L'une des études a également montré une diminution du temps nécessaire pour obtenir une grossesse [209]. Ces deux études ont utilisé la biopsie de l'embryon au stade de clivage et la biopsie des globules polaires, qui ne sont plus actuellement considérées comme des techniques de choix.

Dans l'ensemble, ces cinq études suggèrent que la sélection des embryons euploïdes permet d'améliorer le taux de grossesse après le premier transfert. De plus, la sélection des embryons euploïdes pourrait être utilisée pour favoriser les transferts d'embryon unique et diminuer les grossesses multiples. Enfin, chez les patientes de plus de 35 ans, la sélection des embryons euploïdes permettrait de diminuer le nombre de transferts nécessaires pour obtenir une grossesse et le taux de fausse couche.

Cependant, la dernière étude publiée en 2019 n'a pas confirmé ces résultats [211]. Cette étude était fort attendue car elle a utilisé les deux techniques de pointe, c'est-à-dire la biopsie du trophoctoderme à J5 et le NGS pour l'analyse des chromosomes. De plus, il s'agit d'une étude multicentrique réalisée dans 34 centres de fertilité, travaillant avec 9 laboratoires de génétique répondant à des critères de qualité prédéfinis pour la réalisation du NGS. Elle a inclus 112 patientes de 25 à 40 ans qui étaient randomisées si

elles avaient deux blastocystes de qualité suffisante pour être biopsiés et vitrifiés à J6. Cette étude n'a pas montré d'amélioration du taux de naissance vivante après transfert d'un blastocyste cryopréservé euploïde, par rapport à un blastocyste cryopréservé sélectionné par la morphologie seule. De plus, les taux de fausse couche et d'interruption de grossesse étaient identiques dans les deux groupes. Une analyse secondaire a montré que le taux de naissance vivante après transfert d'un blastocyste euploïde était significativement plus élevé dans le sous-groupe de patientes de 35 à 40 ans, mais pas en intention de traiter. En effet, 13% des patientes dans le groupe traité n'ont pas eu de transfert, car elles n'avaient pas d'embryon euploïde. Cependant, 60% d'entre elles avaient un embryon mosaïque qui n'a pas été transféré. Dans cette étude, les embryons mosaïques représentaient un tiers des embryons. Les résultats en terme de pourcentage d'aneuploïdies, d'embryons mosaïques et de taux de naissance vivante étaient variables entre les centres, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence entre les deux groupes. Les auteurs suggèrent que la standardisation des nouveaux tests diagnostiques et des procédures de laboratoire est essentielle dans les études multicentriques, avant de les introduire en routine clinique [211].

Enfin, Adriaenssens et al ont mené une étude prospective interventionnelle pour comparer la sélection d'un embryon à J3 par la morphologie et la quantification de trois gènes au niveau du cumulus oophorus par qPCR (groupe traité), à la sélection d'1 embryon par la morphologie seule à J3 ou à J5 (groupes contrôle). Les taux de grossesse clinique et de naissance vivante après le transfert frais étaient significativement augmentés dans le groupe traité, par rapport aux deux groupes contrôle, avec diminution du temps pour obtenir une grossesse [157].

Actuellement, le PGT-A est utilisé en routine dans certains centres de fertilité, principalement aux Etats-Unis [205], mais cette technique reste controversée. L'ASRM a publié en 2018 son opinion quant à l'utilisation de cette technique chez les patientes infertiles suivies en FIV. La Société a conclu que, bien que cette technique soit prometteuse, les données scientifiques sont actuellement insuffisantes pour recommander son utilisation en routine [201]. Le « time-lapse » est également utilisé en routine dans certains centres de fertilité, même si sa supériorité par rapport à l'évaluation morphologique séquentielle de l'embryon n'est pas démontrée [146]. Certains insistent sur l'importance de valider de nouveaux tests diagnostiques de façon appropriée avant de les introduire en PMA [316, 318]. D'autres soulignent l'importance de l'expérience du centre de fertilité avant d'utiliser une nouvelle technique ; pour le PGT-A, il faudrait une expérience solide dans la culture prolongée et la biopsie embryonnaire, ainsi qu'une plateforme génétique dont les résultats sont validés [204].

Dans la comparaison des méthodes de sélection embryonnaire, quatre autres points paraissent également importants à discuter :

- le rendement de la technique, c'est-à-dire le nombre d'embryons pour lesquels le résultat du test sera effectivement utilisable pour la sélection embryonnaire
- les facteurs pouvant entraîner une variabilité du biomarqueur de sélection embryonnaire
- la nécessité de réaliser une culture embryonnaire prolongée et/ou une cryopréservation des embryons
- le rapport coût-efficacité de la technique de sélection embryonnaire.

L'analyse de biomarqueurs au niveau du FF, comme le G-CSF, nécessite une ponction folliculaire individuelle, pour pouvoir associer chaque ovocyte au FF dont il est issu. Chaque FF doit être récupéré dans un tube de collecte individuel, et ce tube doit contenir un seul ovocyte après examen microscopique par le biologiste. Le rendement de cette technique dépend donc du nombre de FF qui sont effectivement collectés de façon individuelle. Cette ponction folliculaire individuelle présente quelques inconvénients par rapport à la technique classique ; elle nécessite plusieurs ponctions vaginales, ce qui peut, d'une part, augmenter l'inconfort ressenti par la patiente et, d'autre part, majorer le risque de saignement [163].

Dans ce travail, l'utilisation de la ponction folliculaire individuelle n'a pas entraîné de complications et 70% des FF ont été ponctionnés individuellement [324]. Lédée et al avaient ponctionné 85% des fluides individuellement en utilisant la même technique [177]. Cependant, chaque FF est théoriquement contaminé par le contenu du FF précédent.

Une alternative est d'utiliser un système d'aspiration à double lumière qui permet d'aspirer le contenu du follicule, puis de réaliser un flushing consistant à injecter puis à réaspirer du milieu tampon dans le follicule ponctionné. Cette technique augmente la durée de la ponction [325, 326]. Dans leur étude, Wirleitner et al ont utilisé cette technique de flushing et ont ponctionné 75% des follicules de façon individuelle, sans complication liée à la ponction [327]. Ce flushing permet d'éviter la contamination de chaque FF par le contenu du FF précédent, mais elle introduit une dilution du FF par le milieu tampon. Le flushing doit donc être réalisé avec un volume standard de milieu tampon, pour pouvoir calculer la dilution de chaque FF [163].

Dans ce travail, l'importance d'une standardisation de la technique de ponction a été mise en évidence. En effet, dans l'étude multicentrique, chaque équipe a utilisé sa technique de ponction habituelle. Une différence de concentration moyenne en G-CSF a été mise en évidence entre les 10 centres, alors que le dosage du G-CSF était réalisé dans un laboratoire centralisé [323]. Le type d'aiguille utilisée pour la ponction, la longueur du tuyau d'aspiration et la réalisation ou non d'un flushing, entraînent donc une variabilité de dilution du FF. La standardisation de la technique de ponction est donc indispensable dans les RCT. Par contre, à l'échelle d'une patiente, le principe est de comparer des FF qui seront nécessairement ponctionnés simultanément et selon la même technique. Par conséquent, ce biais de technique n'aura pas d'impact sur la comparaison des FF provenant d'une même patiente.

Avant une utilisation clinique de routine, le rendement de la ponction individuelle (70 à 85%) doit être amélioré pour pouvoir analyser un maximum de FF [177]. L'intérêt du flushing pour améliorer le nombre d'ovocytes ponctionnés est incertain [325, 326].

L'analyse de biomarqueurs au niveau des cellules de la granulosa nécessite également une ponction folliculaire individuelle, ce qui n'est pas le cas pour les autres marqueurs de sélection embryonnaire. Cependant, le rendement des autres tests de qualité embryonnaire n'est pas non plus de 100%. Dans des RCT, l'analyse des gènes du cumulus oophorus, l'étude du métabolome de l'embryon au niveau du milieu de culture et le PGT-A avaient un rendement supérieur à 90% [157, 183, 209, 211]. Le rendement était cependant plus faible pour l'analyse génétique réalisée au niveau des globules polaires, dont les résultats étaient non concluants pour 20% des ovocytes [206].

Certains de ces nouveaux biomarqueurs pourraient être influencés par les caractéristiques de la patiente (indice de masse corporelle, tabagisme, âge,...), la cause de l'infertilité, le traitement de stimulation ovarienne, les conditions de culture

embryonnaire (milieu, température,...),... qui peuvent représenter des facteurs confondants et entraîner une variabilité des résultats qui n'est pas liée à la qualité de l'embryon.

Il a été démontré que le profil d'expression des gènes au niveau des cellules de la granulosa et du cumulus oophorus varie en fonction du protocole de stimulation ovarienne [328, 329]. Ainsi, dans l'étude d'Adriaenssens et al, toutes les patientes ont reçu le même protocole de stimulation [157]. Ce profil d'expression génique pourrait également varier en fonction des caractéristiques de la patiente, de la cause de l'infertilité et du stade de maturation nucléaire de l'ovocyte [148]. Les paramètres morphocinétiques de l'embryon en « time-lapse imaging » pourraient également être influencés par les caractéristiques de la patiente, le traitement de stimulation ovarienne ou les conditions de culture [330]. Le pourcentage d'embryons mosaïques pourrait également dépendre des conditions de culture [315].

Le G-CSF folliculaire est prédictif de l'implantation en cycle naturel [249] et était indépendant du protocole de stimulation ovarienne dans les études menées par Lédée et al, où la plupart des patientes avaient reçu un schéma agoniste [177, 250]. Le G-CSF reste prédictif de l'implantation embryonnaire dans notre étude, où la plupart des patientes ont reçu un schéma antagoniste. Cependant, l'impact potentiel du protocole de stimulation ovarienne sur le taux de G-CSF folliculaire devra être évalué. Le G-CSF est indépendant de la morphologie de l'embryon et peut être utilisé en association avec celle-ci pour améliorer la sélection embryonnaire [177]. Par contre, il diminue avec l'âge de la patiente [250] et pourrait être abaissé en cas de SOMPK associé à un syndrome métabolique [254], en cas d'endométriase avec une réserve ovarienne basse [242] ou en cas d'hyperstimulation ovarienne [250, 252]. Cependant, Sarapik et al n'ont pas montré de différence dans le taux de G-CSF folliculaire chez des patientes atteintes de différentes causes d'infertilité [331]. Ce travail a également montré que le taux de G-CSF folliculaire était indépendant du volume du follicule et du stade de maturation nucléaire de l'ovocyte [324]. Cela corrobore les résultats obtenus par Wirleitner et al sur une plus petite série [327]. L'évaluation du G-CSF folliculaire n'est donc pas redondante par rapport à d'autres paramètres utilisés en routine pour évaluer la qualité ovocytaire.

Les techniques de sélection embryonnaire qui nécessitent une culture prolongée jusque J5-J6 posent la question de la perte potentielle d'embryons qui auraient pu donner une naissance vivante à J3 [206]. En effet, seulement la moitié des embryons à J3 donnent un blastocyste de bonne qualité à J5 [157]. Les marqueurs de qualité ovocytaire comme le G-CSF, les gènes exprimés par le cumulus oophorus ou la biopsie des globules polaires, permettent de réaliser un transfert d'embryon à J3, à la différence de la biopsie de l'embryon à J3 ou J5, qui impose une culture prolongée et éventuellement une cryopréservation des embryons pour réaliser la biopsie et/ou obtenir les résultats de l'analyse chromosomique. En effet, certains blastocystes ne peuvent pas être biopsiés à J5, car ils ne sont pas encore expansés, ce qui empêche de prélever des cellules de trophoblaste. Ces blastocystes peuvent être gardés en culture et biopsiés à J6, ce qui augmente les chances de disposer d'un embryon euploïde. Cependant, ils devront obligatoirement être cryopréservés pour pouvoir être transférés de façon synchrone avec l'endomètre [205, 207]. De plus, la plupart des centres de fertilité ne réalisent pas l'analyse génétique dans leur laboratoire, pour des raisons logistiques et budgétaires. Après la biopsie, les embryons sont donc cryopréservés dans l'attente des résultats génétiques [201].

Le transfert d'embryon frais reste la norme à l'heure actuelle et la cryopréservation est généralement réalisée en seconde intention en cas d'embryon(s) surnuméraire(s), d'endomètre mince, de risque d'hyperstimulation ovarienne,... [207]. Le transfert frais permet au couple une prise en charge immédiate, tout en évitant les coûts additionnels liés à la cryopréservation des embryons, aux traitements et aux rendez-vous médicaux nécessaires pour le transfert d'embryon cryopréservé [205]. De plus, certains embryons ne reprennent pas leur développement après la décongélation, même si les nouvelles techniques de cryopréservation par vitrification donnent de très bons résultats (95% de survie après décongélation [332]). La cryopréservation de tous les embryons ou « freeze-all » a été évaluée dans des RCT comparant le transfert d'embryon frais ou congelé en première intention, pour éviter le biais lié à l'utilisation de l'embryon de morphologie optimale lors des transferts frais [333]. Cette stratégie de « freeze-all » a initialement été utilisée chez les patientes hyper-répondeuses pour limiter le risque d'hyperstimulation ovarienne retardée, liée à l'effet du hCG embryonnaire sur les multiples corps jaunes. De plus, la stimulation ovarienne pourrait avoir un effet délétère sur la réceptivité endométriale ; des taux supraphysiologiques d'oestradiol et une élévation prématurée de la progestérone en fin de phase folliculaire peuvent entraîner un asynchronisme entre l'embryon et l'endomètre. La cryopréservation permet alors de transférer l'embryon lors d'un cycle ultérieur et d'éviter les effets délétères de la stimulation ovarienne sur la réceptivité endométriale. L'utilisation de cette technique de « freeze-all » chez toutes les patientes reste cependant controversée. La méta-analyse de Roque et al publiée en 2019 suggère que l'amélioration du taux de naissance vivante après « freeze-all » serait limitée aux patientes hyper-répondeuses et à celles bénéficiant d'un PGT-A. Le « freeze-all » serait associé à une diminution du risque d'hyperstimulation ovarienne modérée à sévère, mais à une augmentation du risque de pré-éclampsie [333]. Une RCT a d'ailleurs spécifiquement étudié l'intérêt du « freeze-all » chez les patientes suivies en FIV et bénéficiant d'un PGT-A et a montré une amélioration du taux de naissance vivante [205].

Ces nouveaux tests de qualité embryonnaire nécessitent un matériel spécifique, un personnel qualifié et une culture individuelle des embryons, ce qui représente un surcoût par rapport à la prise en charge standard. Le rapport coût-bénéfice de ces nouveaux biomarqueurs de qualité embryonnaire doit donc être évalué. Par exemple, la biopsie des embryons d'une patiente peut ajouter 8h de travail cumulé aux biologistes [201].

Le dosage du G-CSF folliculaire par ELISA présente ici un intérêt particulier, puisqu'il s'agit d'une technique simple, rapide (3h), peu coûteuse, qui ne nécessite pas de plateforme technique complexe, par rapport au PGT-A ou à l'analyse des gènes exprimés par le cumulus oophorus [154].

L'évaluation du rapport coût-efficacité des nouveaux biomarqueurs de qualité embryonnaire est complexe. L'analyse du coût doit prendre en compte le cycle de FIV, la technique de sélection embryonnaire, l'éventuel transfert d'embryon frais, la cryopréservation, le nombre de transferts d'embryon cryopréservé, les fausses couches et leur prise en charge, le suivi obstétrical et néonatal en cas de grossesse compliquée par une aneuploïdie [204]. En effet, une réduction des aneuploïdies diagnostiquées pendant la grossesse favoriserait le PGT-A. Enfin, la diminution des grossesses multiples et de leurs complications spécifiques, dont les admissions aux soins intensifs néonataux, doit également être prise en compte si le nouveau biomarqueur permet de favoriser les transferts d'embryon unique. En effet, les accouchements de jumeaux représenteraient

un coût jusqu'à cinq fois plus élevé que celui des singletons [334]. Rubio et al ont évalué le rapport coût-efficacité du PGT-A dans leur étude et ont conclu que le coût supplémentaire par enfant né vivant était de 8%. Ce surcoût a permis de diminuer le temps nécessaire pour obtenir une naissance vivante et le nombre de fausse couche. Grâce à la nouvelle technologie de NGS, ils suggèrent que le coût par enfant né vivant serait même diminué de 12% en Europe et de 10% aux USA [209].

En résumé, ce travail s'intéresse à un nouveau marqueur de sélection embryonnaire, le G-CSF folliculaire. Puisqu'il s'agit d'un marqueur de qualité ovocytaire quantifié au niveau du FF, il ne tient pas compte de l'impact des facteurs paternels et des conditions de culture sur le développement embryonnaire. Ce nouveau marqueur a l'avantage d'être non subjectif et non invasif, mais son utilisation nécessite la réalisation d'une ponction folliculaire et d'une culture embryonnaire individuelles, pour assurer la traçabilité entre l'embryon et le FF qui lui est associé. Ce marqueur est indépendant du volume du follicule, de la maturité nucléaire de l'ovocyte évaluée par l'observation du stade de la méiose et de la morphologie embryonnaire. Enfin, ses avantages principaux sont un faible coût et une technique de quantification simple par un ELISA spécifique, qui ne nécessite pas de manipulation embryonnaire ni de plateforme complexe par rapport aux autres techniques de sélection. De plus, les résultats sont disponibles rapidement, ce qui permet de réaliser un transfert d'embryon frais à J3 ou à J5. Une RCT est en cours pour évaluer son intérêt, en association avec la morphologie, dans la sélection d'un embryon compétent à J3.

2. Intérêt du G-CSF dans la prise en charge de l'infertilité

En plus d'être un biomarqueur de qualité ovocytaire, le rhG-CSF est proposé comme outil thérapeutique dans la prise en charge des troubles de l'ovulation, des endomètres minces réfractaires, des fausses couches à répétition et des échecs d'implantation répétés. Dans ces indications, le G-CSF est étudié de manière empirique. En effet, son mécanisme d'action potentiel au niveau de la maturation ovocytaire, du développement et de l'implantation de l'embryon, de la croissance et de la réceptivité de l'endomètre, reste peu connu.

Dans ce travail, nous avons étudié les cellules et les mécanismes responsables de la production du G-CSF au niveau du follicule pré-ovulatoire, et en particulier, l'interaction entre les cellules de la granulosa et les leucocytes. En effet, une accumulation de leucocytes (neutrophiles et macrophages) a lieu au niveau du follicule pré-ovulatoire [8], et ceux-ci sont de plus en plus reconnus comme acteurs de l'ovulation [6, 7]. La production de G-CSF était significativement majorée en cas de coculture de cellules de la granulosa avec des leucocytes. Ces derniers induisaient la production de G-CSF par les cellules de la granulosa. Cet effet était maximal quand les leucocytes étaient isolés juste avant l'ovulation, que ce soit à partir du sang périphérique de femmes témoins en fin de phase folliculaire, ou de patientes traitées par FIV au moment de la ponction. Cet effet était plus important quand les leucocytes étaient isolés à partir du FF par rapport au sang des patientes suivies en FIV ; la population de leucocytes isolée à partir du FF contenait une proportion augmentée de granulocytes. Cette étude a donc montré que l'augmentation du G-CSF folliculaire au moment de l'ovulation coïncide avec une accumulation de granulocytes au niveau du FF. De par son rôle dans la

granulopoïèse, le G-CSF pourrait participer à cette accumulation de granulocytes, comme l'avait suggéré Makinoda [247]. Ainsi, des taux élevés de G-CSF folliculaire pourraient être observés dans les follicules où l'interaction paracrine entre les cellules de la granulosa et les leucocytes est optimale. Cela pourrait contribuer à la maturation folliculaire et expliquer le taux d'implantation majoré des embryons issus des FF avec un taux de G-CSF élevé.

D'autres hypothèses ont été évoquées pour expliquer l'intérêt du G-CSF dans la prise en charge de l'infertilité.

Premièrement, Cai et al ont étudié l'impact d'un traitement par rhG-CSF sur la maturation d'ovocytes de porc *in vitro* [335]. Ils ont montré que le traitement des ovocytes immatures par rhG-CSF était associé à une diminution du taux intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène au niveau des ovocytes, à une augmentation de l'expression de gènes anti-apoptotiques et de gènes liés à la maturation ovocytaire au niveau du cumulus oophorus, ainsi qu'à une augmentation du développement des embryons après FIV. Les ovocytes de porc, ainsi que les cellules de la granulosa, expriment l'ARNm du G-CSF et de son récepteur. Les auteurs ont conclu que le traitement par rhG-CSF augmentait la viabilité des ovocytes de porc. Chez l'homme, un effet bénéfique a été démontré pour l'ajout du GM-CSF au niveau du milieu de culture des embryons [336, 337] et un brevet a été déposé [221].

Le G-CSF pourrait aussi participer à des phénomènes d'auto-réparation de l'embryon [338], puisque cet effet a été démontré dans d'autres tissus (foie, cerveau, cœur,...) par mobilisation de cellules souches hématopoïétiques, par activation de cellules souches endogènes ou par un effet anti-apoptotique *in situ* [339-341].

Deuxièmement, le G-CSF pourrait avoir un effet trophique et pro-angiogénique au niveau de l'endomètre, et ainsi améliorer la croissance et la réceptivité endométriale.

Le G-CSF et son récepteur sont exprimés par les cellules endométriales et le G-CSF est capable d'entraîner la décidualisation de cellules stromales endométriales *in vitro* [342]. Des cellules souches adultes capables de reconstruire l'endomètre, ainsi que des cellules souches hématopoïétiques dérivées de la moëlle osseuse, sont présentes au niveau de l'endomètre humain [343]. Ainsi, le G-CSF pourrait avoir un impact sur la croissance de l'endomètre, via une stimulation de cellules souches endométriales et/ou une mobilisation des cellules souches de la moëlle osseuse [221]. Cet effet régulateur de la croissance endométriale a été démontré pour le M-CSF [344].

Un effet pro-angiogénique du G-CSF a été démontré chez l'homme au niveau du réseau vasculaire coronaire. Cet effet est lié à une augmentation des cellules progénitrices endothéliales et des monocytes périphériques, et à l'induction d'un profil d'expression de gènes pro-artériogéniques au niveau de ces monocytes. D'où l'hypothèse d'un rôle potentiel du G-CSF au niveau du remodelage vasculaire endométrial [221, 276].

Rahmati et al ont comparé l'expression de l'ARNm de différents gènes cibles du G-CSF au niveau de biopsies d'endomètre de femmes fertiles ou infertiles souffrant de fausses couches ou d'échecs d'implantation répétés et inexplicés. Ces gènes cibles du G-CSF sont impliqués dans l'adhésion de l'embryon, la migration cellulaire, le remodelage tissulaire et l'angiogenèse. L'expression de ces gènes était différente entre les patientes fertiles et infertiles, ce qui pourrait expliquer l'intérêt du G-CSF dans la prise en charge de l'infertilité [285]. En particulier, l'expression de l'ARNm du récepteur au G-CSF était significativement diminuée au niveau de l'endomètre des patientes infertiles souffrant

d'échecs d'implantation répétés, et un traitement par G-CSF à haute dose pouvait augmenter l'expression du G-CSFR.

Troisièmement, il est généralement admis que l'établissement et le maintien d'une immunotolérance au niveau de l'interface foeto-maternelle est nécessaire à l'implantation embryonnaire et que, par conséquent, certains échecs d'implantation pourraient avoir une cause immunologique. Cette immunotolérance est associée à un déplacement de la balance entre les immunités de type Th1 pro-inflammatoire et Th2 anti-inflammatoire vers la prédominance du type Th2, ainsi qu'à une prolifération des lymphocytes T régulateurs [345, 346]. Le G-CSF pourrait être impliqué dans cette immunotolérance. Comme décrit précédemment, le G-CSF est capable de favoriser une réponse immunitaire de type Th2 et de promouvoir le développement de lymphocytes T régulateurs [220, 229]. Le G-CSF pourrait aussi diminuer la cytotoxicité de cellules mononucléées déciduals, dont les cellules NK [347].

Dans ce travail, le taux de G-CSF folliculaire était minimal en cas de fausse couche [324]. Lédée et al ont rapporté des résultats similaires [249] et ont proposé l'hypothèse selon laquelle le niveau de G-CSF folliculaire refléterait l'habilité de l'ovocyte à mener un dialogue précoce avec son environnement. La qualité de l'ovocyte dépendrait de sa capacité à préparer un utérus réceptif, en l'orientant vers une voie de tolérance immunitaire [250, 348].

Enfin, le G-CSF et son récepteur sont présents au niveau de l'interface foeto-maternelle avec des variations d'expression pendant la grossesse [222, 234, 235, 349]. De plus, le G-CSF stimule la croissance trophoblastique [223, 256] et son taux sérique augmente en cas de grossesse spontanée ou après FIV/ICSI [242, 255]. Chez la souris, la multiparité favorise le maintien d'une grossesse et a été associée à une accumulation de macrophages [350], ainsi qu'à une majoration de l'expression du G-CSF au niveau du placenta de souris multipares [351]. Ces résultats suggèrent un rôle du G-CSF dans la placentation et le maintien de la grossesse.

Suite à cette accumulation de données suggérant un rôle du G-CSF dans la fertilité, Wurfel a d'ailleurs introduit la notion de « Implantative G-CSF Deficiency Syndrome ». Ce syndrome concernerait un sous-groupe de patientes pour lesquelles le trouble de l'implantation serait lié à un déficit en G-CSF [221]. De nouvelles études sont cependant nécessaires pour établir les patientes cibles, ainsi que les modalités (voie d'administration, dosage, durée,...) d'un traitement par G-CSF.

Perspectives

1. Intérêt du G-CSF folliculaire comme marqueur de sélection embryonnaire

L'utilisation du G-CSF folliculaire quantifié par ELISA comme marqueur de sélection embryonnaire doit être validée dans des études prospectives randomisées contrôlées. Ces études sont actuellement en cours ; elles ont pour objectif de comparer le taux d'implantation d'un embryon sélectionné à J3 par la combinaison morphologie et G-CSF, par rapport à un embryon choisi par la morphologie seule. Si ces études confirment l'intérêt du G-CSF folliculaire quantifié par ELISA, d'autres objectifs devront être évalués. En effet, un nouveau marqueur de sélection embryonnaire efficace devrait permettre de diminuer le nombre de transferts et le délai nécessaires pour obtenir une naissance vivante. Un objectif additionnel serait de diminuer le taux de fausse couche et de confirmer nos résultats préliminaires qui suggèrent des taux de G-CSF abaissés dans cette situation. Enfin, le rapport coût-bénéfice de cette nouvelle technique devra également être évalué.

Suite à l'augmentation des transferts d'embryons au stade de blastocyste, il serait également intéressant de savoir si la sélection par la combinaison morphologie et G-CSF garde un intérêt en culture prolongée. De plus, la comparaison entre un transfert d'embryon unique sélectionné par la combinaison morphologie et G-CSF à J3 et un transfert d'un blastocyste sélectionné par la morphologie seule à J5 ou J6, permettrait d'évaluer l'intérêt de la quantification du G-CSF pour éviter la culture prolongée et ses potentiels effets indésirables. Le taux de naissance cumulé par cycle serait ici un objectif additionnel, qui permettrait d'évaluer si la culture prolongée conduit à la perte d'embryons qui auraient pu donner une naissance vivante à J3.

Enfin, le dosage du G-CSF folliculaire présente un intérêt particulier pour les patientes souhaitant bénéficier d'une préservation de la fertilité par congélation d'ovocytes. En effet, la morphologie est peu discriminante de la qualité de l'ovocyte et de sa capacité à être fécondé et à donner un enfant vivant [150, 151]. Ainsi, le G-CSF pourrait être évalué comme marqueur de qualité ovocytaire dans ce sous-groupe de patientes.

2. Intérêt du G-CSF dans la prise en charge de l'infertilité

Ce travail a montré que la sécrétion du G-CSF folliculaire par les cellules de la granulosa était induite par les leucocytes juste avant l'ovulation. La suite logique de ce travail est d'identifier le type de leucocyte responsable de l'induction de la sécrétion de G-CSF. Nous avons réalisé un marquage intracellulaire du G-CSF au niveau des cellules de la granulosa et des leucocytes isolés à partir du FF par cytométrie de flux. Cependant, les résultats étaient non concluants suite à un manque de spécificité des anticorps disponibles pour le marquage du G-CSF. Une alternative serait de séparer les différents types de leucocytes obtenus à partir des FF et de réaliser des cocultures de cellules de la granulosa avec chaque type de leucocytes, en quantifiant le G-CSF sécrété dans le milieu de culture.

En ce qui concerne la maturation ovocytaire, il a été démontré chez l'animal que les ovocytes expriment l'ARNm du récepteur, et dans une moindre mesure du G-CSF, et que l'ajout de G-CSF au niveau du milieu de culture a un effet bénéfique sur la maturation ovocytaire. Il serait intéressant de reproduire ces résultats avec des ovocytes humains immatures non utilisés en FIV, même si cela est plus compliqué d'un point de vue éthique. L'expression de gènes liés à la maturation ovocytaire et de gènes anti-apoptotiques pourrait être étudiée, comme cela a été réalisé chez l'animal. De façon préliminaire, nous avons mis en évidence l'expression de l'ARNm du récepteur au G-CSF (mais pas du G-CSF), au niveau de certains ovocytes immatures humains.

Conclusion

Ce travail s'intéresse à un nouveau marqueur de qualité ovocytaire et de sélection embryonnaire en FIV, le G-CSF folliculaire.

Son application en routine clinique dépend de sa facilité d'implémentation au laboratoire. Les premières études qui ont identifié le G-CSF folliculaire comme marqueur prédictif de l'implantation embryonnaire ont utilisé la technique de multiplex. Celle-ci nécessite une plateforme complexe, dont l'achat et la maintenance représentent un coût élevé. Nous avons bénéficié d'un ELISA ultra-sensible et spécifiquement dédié à la quantification du G-CSF folliculaire, dont les résultats peuvent être obtenus rapidement. Cet ELISA a été évalué dans deux études observationnelles. Une première étude multicentrique a souligné l'importance d'une standardisation de la technique de ponction folliculaire individuelle. La probabilité d'implantation était plus élevée pour la catégorie d'embryons issus d'un FF avec un taux de G-CSF élevé, mais les résultats n'étaient pas significatifs. Cela s'explique probablement par des différences dans la dilution des FF entre les centres de fertilité, suite à une variabilité de la technique de ponction. En effet, la différence de taux d'implantation entre les catégories d'embryons était plus prononcée si les résultats d'un seul centre étaient pris en compte. Une seconde étude unicentrique a montré que ce marqueur était indépendant d'autres facteurs utilisés pour évaluer la qualité ovocytaire, c'est-à-dire le volume du follicule et la maturité nucléaire de l'ovocyte, et a confirmé le taux d'implantation plus élevé des embryons issus d'un FF avec un taux de G-CSF élevé. La quantification du G-CSF folliculaire par ELISA doit être validée dans des études prospectives randomisées contrôlées qui comparent le taux d'implantation d'un embryon sélectionné par la combinaison morphologie et G-CSF, par rapport à la morphologie seule.

Ce travail s'intéresse également à l'origine du G-CSF folliculaire. Nos résultats ont montré que la production de G-CSF par les cellules de la granulosa était fortement induite par la coculture avec des leucocytes obtenus à partir du FF ou du sang périphérique. Cet effet était maximal quand les leucocytes provenaient du sang périphérique de femmes témoins en fin de phase folliculaire, juste avant l'ovulation. De plus, la production de G-CSF était également significativement majorée quand les cellules de la granulosa étaient cultivées avec des leucocytes isolés à partir du FF par rapport au sang périphérique de patientes suivies en FIV. Chez ces patientes, la proportion de granulocytes était plus importante au niveau du FF par rapport au sang correspondant. Ainsi, l'augmentation du G-CSF folliculaire au moment de l'ovulation coïncide avec une accumulation de granulocytes au niveau du FF. Le rôle des leucocytes, et en particulier des granulocytes, dans l'ovulation est de plus en plus reconnu : ils favoriseraient l'ovulation par la production de cytokines/chémokines et la libération d'enzymes protéolytiques. Ainsi, le G-CSF pourrait participer au recrutement des leucocytes au niveau du follicule pré-ovulatoire. Des taux élevés de G-CSF pourraient être observés dans les follicules où l'interaction entre les cellules de la granulosa et les leucocytes est optimale. Cela pourrait contribuer à la maturation folliculaire et expliquer le taux d'implantation majoré des embryons issus des FF avec un taux de G-CSF élevé. Des travaux ultérieurs devront préciser le type de leucocyte impliqué dans l'induction de la sécrétion du G-CSF par les cellules de la granulosa et l'impact potentiel du G-CSF sur la maturation ovocytaire.

Bibliographie

Photo de couverture :

Yorgos Nikas (2012) CIL:38976, Homo sapiens, embryonic gland hemocyte. CIL. Dataset.
<https://doi.org/doi:10.7295/W9CIL38976>

REFERENCE LIST

1. Larsen, W., *Embryologie humaine*. 2 ed. 2003, Bruxelles. 548.
2. Letombe, B., S. Catteau-Jonard, and G. Robin, *Endocrinologie en gynécologie et obstétrique*. 1 ed. 2012, Issy-les-Moulineaux. 284.
3. Poncelet, C. and C. Sifer, *Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*. 1 ed. 2011, Paris.
4. Georges, A., et al., *FOXL2: a central transcription factor of the ovary*. J Mol Endocrinol, 2014. **52**(1): p. R17-33.
5. Broekmans, F.J., M.R. Soules, and B.C. Fauser, *Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences*. Endocr Rev, 2009. **30**(5): p. 465-93.
6. Duffy, D.M., et al., *Ovulation: Parallels with Inflammatory Processes*. Endocr Rev, 2018.
7. Espey, L.L., *Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis*. Biol Reprod, 1980. **22**(1): p. 73-106.
8. Brannstrom, M., et al., *Localization of leukocyte subsets in the follicle wall and in the corpus luteum throughout the human menstrual cycle*. Fertil Steril, 1994. **61**(3): p. 488-95.
9. Best, C.L., et al., *Localization and characterization of white blood cell populations within the human ovary throughout the menstrual cycle and menopause*. Hum Reprod, 1996. **11**(4): p. 790-7.
10. Takaya, R., et al., *Macrophages in normal cycling human ovaries; immunohistochemical localization and characterization*. Hum Reprod, 1997. **12**(7): p. 1508-12.
11. Suzuki, T., et al., *Leukocytes in normal-cycling human ovaries: immunohistochemical distribution and characterization*. Hum Reprod, 1998. **13**(8): p. 2186-91.
12. Chang, R.J., A. Gougeon, and G.F. Erickson, *Evidence for a neutrophil-interleukin-8 system in human folliculogenesis*. Am J Obstet Gynecol, 1998. **178**(4): p. 650-7.
13. Piccinni, M.P., et al., *Production of IL-4 and leukemia inhibitory factor by T cells of the cumulus oophorus: a favorable microenvironment for pre-implantation embryo development*. Eur J Immunol, 2001. **31**(8): p. 2431-7.
14. Castro, A., et al., *Luteal leukocytes are modulators of the steroidogenic process of human mid-luteal cells*. Hum Reprod, 1998. **13**(6): p. 1584-9.
15. Hameed, A., et al., *Perforin expression in human cell-mediated luteolysis*. Int J Gynecol Pathol, 1995. **14**(2): p. 151-7.
16. Nio-Kobayashi, J., et al., *Regulated C-C motif ligand 2 (CCL2) in luteal cells contributes to macrophage infiltration into the human corpus luteum during luteolysis*. Mol Hum Reprod, 2015. **21**(8): p. 645-54.
17. Loukides, J.A., et al., *Human follicular fluids contain tissue macrophages*. J Clin Endocrinol Metab, 1990. **71**(5): p. 1363-7.
18. Drosch, K., et al., *Distribution of T cell subsets in follicular fluid*. Fertil Steril, 1988. **50**(4): p. 618-21.
19. Hill, J.A., R.L. Barbieri, and D.J. Anderson, *Detection of T8 (suppressor/cytotoxic) lymphocytes in human ovarian follicular fluid*. Fertil Steril, 1987. **47**(1): p. 114-7.

20. Smith, M.P., et al., *Leukocyte origin and profile in follicular aspirates at oocyte retrieval*. Hum Reprod, 2005. **20**(12): p. 3526-31.
21. Fedorcsak, P., M. Raki, and R. Storeng, *Characterization and depletion of leukocytes from cells isolated from the pre-ovulatory ovarian follicle*. Hum Reprod, 2007. **22**(4): p. 989-94.
22. Baranao, R.I., et al., *Human granulosa cells express HLA-DR antigen and are capable of synthesizing interleukin-1*. Horm Metab Res, 1995. **27**(11): p. 495-8.
23. Brannstrom, M. and A. Enskog, *Leukocyte networks and ovulation*. J Reprod Immunol, 2002. **57**(1-2): p. 47-60.
24. Bukulmez, O. and A. Arici, *Leukocytes in ovarian function*. Hum Reprod Update, 2000. **6**(1): p. 1-15.
25. Garcia-Velasco, J.A. and A. Arici, *Chemokines and human reproduction*. Fertil Steril, 1999. **71**(6): p. 983-93.
26. Brannstrom, M., G. Mayrhofer, and S.A. Robertson, *Localization of leukocyte subsets in the rat ovary during the periovulatory period*. Biol Reprod, 1993. **48**(2): p. 277-86.
27. Oakley, O.R., et al., *Periovulatory leukocyte infiltration in the rat ovary*. Endocrinology, 2010. **151**(9): p. 4551-9.
28. Hellberg, P., et al., *Leukocyte supplementation increases the luteinizing hormone-induced ovulation rate in the in vitro-perfused rat ovary*. Biol Reprod, 1991. **44**(5): p. 791-7.
29. Brannstrom, M., et al., *Reduction of ovulation rate in the rat by administration of a neutrophil-depleting monoclonal antibody*. J Reprod Immunol, 1995. **29**(3): p. 265-70.
30. Van der Hoek, K.H., et al., *Intrabursal injection of clodronate liposomes causes macrophage depletion and inhibits ovulation in the mouse ovary*. Biol Reprod, 2000. **62**(4): p. 1059-66.
31. Cohen, P.E., L. Zhu, and J.W. Pollard, *Absence of colony stimulating factor-1 in osteopetrotic (csfmop/csfmop) mice disrupts estrous cycles and ovulation*. Biol Reprod, 1997. **56**(1): p. 110-8.
32. Halme, J., et al., *Peritoneal macrophages modulate human granulosa-luteal cell progesterone production*. J Clin Endocrinol Metab, 1985. **61**(5): p. 912-6.
33. Emi, N., et al., *Lymphocytes stimulate progesterone production by cultured human granulosa luteal cells*. Am J Obstet Gynecol, 1991. **165**(5 Pt 1): p. 1469-74.
34. Beckmann, M.W., et al., *Human ovarian granulosa cell culture: determination of blood cell contamination and evaluation of possible culture purification steps*. Fertil Steril, 1991. **56**(5): p. 881-7.
35. Shirai, F., et al., *Human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes at the ovulatory period are in an activated state*. Mol Cell Endocrinol, 2002. **196**(1-2): p. 21-8.
36. Wu, R., et al., *Macrophage contributions to ovarian function*. Hum Reprod Update, 2004. **10**(2): p. 119-33.
37. Field, S.L., et al., *Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation*. Mol Reprod Dev, 2014. **81**(4): p. 284-314.
38. Arici, A., et al., *Monocyte chemotactic protein-1 expression in human preovulatory follicles and ovarian cells*. J Reprod Immunol, 1997. **32**(3): p. 201-19.
39. Oral, E., et al., *Growth-regulated alpha expression in human preovulatory follicles and ovarian cells*. Am J Reprod Immunol, 1997. **38**(1): p. 19-25.

40. Keck, C., et al., *Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptors in human granulosa lutein cells*. Mol Hum Reprod, 1998. **4**(11): p. 1071-6.
41. Dahm-Kahler, P., et al., *Monocyte chemotactic protein-1 in the follicle of the menstrual and IVF cycle*. Mol Hum Reprod, 2006. **12**(1): p. 1-6.
42. Karstrom-Encrantz, L., et al., *Selective presence of the chemokine growth-regulated oncogene alpha (GROalpha) in the human follicle and secretion from cultured granulosa-lutein cells at ovulation*. Mol Hum Reprod, 1998. **4**(11): p. 1077-83.
43. Runesson, E., et al., *The human preovulatory follicle is a source of the chemotactic cytokine interleukin-8*. Mol Hum Reprod, 1996. **2**(4): p. 245-50.
44. Arici, A., et al., *Interleukin-8 expression and modulation in human preovulatory follicles and ovarian cells*. Endocrinology, 1996. **137**(9): p. 3762-9.
45. Polec, A., et al., *Interaction between granulosa-lutein cells and monocytes regulates secretion of angiogenic factors in vitro*. Hum Reprod, 2011. **26**(10): p. 2819-29.
46. Barak, V., et al., *Interleukin-1: local production and modulation of human granulosa luteal cells steroidogenesis*. Fertil Steril, 1992. **58**(4): p. 719-25.
47. Carlberg, M., et al., *Elevated expression of tumour necrosis factor alpha in cultured granulosa cells from women with endometriosis*. Hum Reprod, 2000. **15**(6): p. 1250-5.
48. Zolti, M., et al., *Granulosa cells as a source and target organ for tumor necrosis factor-alpha*. FEBS Lett, 1990. **261**(2): p. 253-5.
49. Haskill, S., et al., *Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(19): p. 7732-6.
50. Yoshimura, T., et al., *Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes*. J Immunol, 1989. **142**(6): p. 1956-62.
51. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(6): p. 313-26.
52. Ataie-Kachoie, P., M.H. Pourgholami, and D.L. Morris, *Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2013. **24**(2): p. 163-73.
53. Schaper, F. and S. Rose-John, *Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade*. Cytokine Growth Factor Rev, 2015. **26**(5): p. 475-87.
54. Gerard, N., et al., *The interleukin-1 system and female reproduction*. J Endocrinol, 2004. **180**(2): p. 203-12.
55. Wang, L.J., et al., *Tumor necrosis factor alpha in the human ovary: presence in follicular fluid and effects on cell proliferation and prostaglandin production*. Fertil Steril, 1992. **58**(5): p. 934-40.
56. Wilson, L., C.J. Butcher, and S. Kellie, *Calcium ionophore A23187 induces interleukin-8 gene expression and protein secretion in human monocytic cells*. FEBS Lett, 1993. **325**(3): p. 295-8.
57. Buyalos, R.P., J.M. Watson, and O. Martinez-Maza, *Detection of interleukin-6 in human follicular fluid*. Fertil Steril, 1992. **57**(6): p. 1230-4.
58. Salmassi, A., et al., *Interaction of interleukin-6 on human granulosa cell steroid secretion*. J Endocrinol, 2001. **170**(2): p. 471-8.
59. Wang, L.J. and R.J. Norman, *Concentrations of immunoreactive interleukin-1 and interleukin-2 in human preovulatory follicular fluid*. Hum Reprod, 1992. **7**(2): p. 147-50.

60. Kawano, Y., et al., *The production and clinical evaluation of macrophage colony-stimulating factor and macrophage chemoattractant protein-1 in human follicular fluids*. Am J Reprod Immunol, 2001. **45**(1): p. 1-5.
61. Kawasaki, F., et al., *The clinical role of interleukin-6 and interleukin-6 soluble receptor in human follicular fluids*. Clin Exp Med, 2003. **3**(1): p. 27-31.
62. Baggiolini, M., P. Loetscher, and B. Moser, *Interleukin-8 and the chemokine family*. Int J Immunopharmacol, 1995. **17**(2): p. 103-8.
63. Wuyts, A., et al., *Leukocyte recruitment by monocyte chemotactic proteins (MCPs) secreted by human phagocytes*. J Immunol Methods, 1994. **174**(1-2): p. 237-47.
64. Senturk, L.M., et al., *Monocyte chemotactic protein-1 expression in human corpus luteum*. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(8): p. 697-702.
65. Dahm-Kahler, P., et al., *Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), its receptor, and macrophages in the perifollicular stroma during the human ovulatory process*. Fertil Steril, 2009. **91**(1): p. 231-9.
66. Koch, A.E., et al., *Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis*. Science, 1992. **258**(5089): p. 1798-801.
67. Motro, B., et al., *Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(8): p. 3092-6.
68. Maruo, N., et al., *IL-6 increases endothelial permeability in vitro*. Endocrinology, 1992. **131**(2): p. 710-4.
69. Loret de Mola, J.R., et al., *Elevated interleukin-6 levels in the ovarian hyperstimulation syndrome: ovarian immunohistochemical localization of interleukin-6 signal*. Obstet Gynecol, 1996. **87**(4): p. 581-7.
70. Brannstrom, M., et al., *Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on ovulation in the rat ovary*. Reprod Fertil Dev, 1995. **7**(1): p. 67-73.
71. Brannstrom, M., L. Wang, and R.J. Norman, *Ovulatory effect of interleukin-1 beta on the perfused rat ovary*. Endocrinology, 1993. **132**(1): p. 399-404.
72. Watanabe, H., et al., *Interleukin-1 beta stimulates prostaglandin E2 and F2 alpha synthesis in human ovarian granulosa cells in culture*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1993. **49**(6): p. 963-7.
73. Sasson, R., et al., *Induction of apoptosis in granulosa cells by TNF alpha and its attenuation by glucocorticoids involve modulation of Bcl-2*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(1): p. 51-9.
74. Dang, X., et al., *IL-1beta Upregulates StAR and Progesterone Production Through the ERK1/2- and p38-Mediated CREB Signaling Pathways in Human Granulosa-Lutein Cells*. Endocrinology, 2017. **158**(10): p. 3281-3291.
75. Harkin, D.G., et al., *Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes towards human pre-ovulatory follicular fluid and serum using a 'sparse-pore' polycarbonate filtration membrane*. J Reprod Immunol, 1994. **27**(2): p. 151-5.
76. Herriot, D.M., G.M. Warnes, and J.F. Kerin, *Pregnancy-related chemotactic activity of human follicular fluid*. Fertil Steril, 1986. **45**(2): p. 196-201.
77. Frederick, J.L., T. Shimanuki, and G.S. diZerega, *Initiation of angiogenesis by human follicular fluid*. Science, 1984. **224**(4647): p. 389-90.
78. Lessey, B.A. and S.L. Young, *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology : Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management Chapter 9 - Structure, Function, and Evaluation of the Female Reproductive Tract*. 8 ed, ed. J.F. Strauss and R.L. Barbieri. 2019, Philadelphia: Elsevier. 1006.

79. Simon, C., et al., *Molecular interactions between embryo and uterus in the adhesion phase of human implantation*. Hum Reprod, 1998. **13 Suppl 3**: p. 219-32; discussion 233-6.
80. Craciunas, L., et al., *Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis*. Hum Reprod Update, 2019. **25**(2): p. 202-223.
81. Kwak-Kim, J., *Endometrial Gene Expression An Emerging Paradigm for Reproductive Disorders*. 1 ed. 2020, Cham. 220.
82. Tsampalas, M., et al., *Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties*. J Reprod Immunol, 2010. **85**(1): p. 93-8.
83. Cha J., et al., *Molecular interplay in successful implantation*, in *Ten critical topics in reproductive medicine.*, S. Sanders, Editor. 2013: Washington.
84. Stewart, C.L., et al., *Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor*. Nature, 1992. **359**(6390): p. 76-9.
85. Saito, S., et al., *Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 601-10.
86. Hyde, K.J. and D.J. Schust, *Immunologic challenges of human reproduction: an evolving story*. Fertil Steril, 2016. **106**(3): p. 499-510.
87. Perrier d'Hauterive, 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**(11): p. 2633-43.
88. Berndt, S., et al., *Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium*. FASEB J, 2006. **20**(14): p. 2630-2.
89. Berndt, S., et al., *Chorionic gonadotropin stimulation of angiogenesis and pericyte recruitment*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(11): p. 4567-74.
90. Perrier d'Hauterive, S., et al., *Dialogue between blastocyst hCG and endometrial LH/hCG receptor: which role in implantation?* Gynecol Obstet Invest, 2007. **64**(3): p. 156-60.
91. Munro, M.G., *Uterine polyps, adenomyosis, leiomyomas, and endometrial receptivity*. Fertil Steril, 2019. **111**(4): p. 629-640.
92. Robertson, S.A., A.S. Care, and L.M. Moldenhauer, *Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy*. J Clin Invest, 2018. **128**(10): p. 4224-4235.
93. Benner, M., et al., *How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium*. Hum Reprod Update, 2018. **24**(4): p. 393-415.
94. Jabrane-Ferrat, N., *Features of Human Decidual NK Cells in Healthy Pregnancy and During Viral Infection*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1397.
95. Le Bouteiller, P. and M.P. Piccinni, *Human NK cells in pregnant uterus: why there?* Am J Reprod Immunol, 2008. **59**(5): p. 401-6.
96. Ledee-Bataille, N., et al., *A new role for natural killer cells, interleukin (IL)-12, and IL-18 in repeated implantation failure after in vitro fertilization*. Fertil Steril, 2004. **81**(1): p. 59-65.
97. Faas, M.M. and P. de Vos, *Uterine NK cells and macrophages in pregnancy*. Placenta, 2017. **56**: p. 44-52.

98. Wegmann, T.G., et al., *Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?* Immunol Today, 1993. **14**(7): p. 353-6.
99. Polese, B., et al., *The Endocrine Milieu and CD4 T-Lymphocyte Polarization during Pregnancy.* Front Endocrinol (Lausanne), 2014. **5**: p. 106.
100. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.* Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
101. Piccinni, M.P., et al., *Defective production of LIF, M-CSF and Th2-type cytokines by T cells at fetomaternal interface is associated with pregnancy loss.* J Reprod Immunol, 2001. **52**(1-2): p. 35-43.
102. Miyazaki, S., et al., *Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua.* J Leukoc Biol, 2003. **74**(4): p. 514-22.
103. Chaouat, G., et al., *Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy.* J Reprod Fertil, 1990. **89**(2): p. 447-58.
104. Raghupathy, R., et al., *Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions.* Cell Immunol, 1999. **196**(2): p. 122-30.
105. Jenkins, C., et al., *Evidence of a T(H) 1 type response associated with recurrent miscarriage.* Fertil Steril, 2000. **73**(6): p. 1206-8.
106. Chaouat, G., *The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy?* Semin Immunopathol, 2007. **29**(2): p. 95-113.
107. Svensson, L., et al., *The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice.* J Reprod Immunol, 2001. **51**(1): p. 3-7.
108. Mor, G., et al., *Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site.* Ann N Y Acad Sci, 2011. **1221**: p. 80-7.
109. Micallef, A., et al., *The role of interferons in early pregnancy.* Gynecol Endocrinol, 2014. **30**(1): p. 1-6.
110. Caramalho, I., et al., *Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus.* Front Immunol, 2015. **6**: p. 395.
111. Aluvihare, V.R., M. Kallikourdis, and A.G. Betz, *Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus.* Nat Immunol, 2004. **5**(3): p. 266-71.
112. Heikkinen, J., et al., *Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua.* Clin Exp Immunol, 2004. **136**(2): p. 373-8.
113. Shima, T., et al., *Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice.* J Reprod Immunol, 2010. **85**(2): p. 121-9.
114. Sasaki, Y., et al., *Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases.* Mol Hum Reprod, 2004. **10**(5): p. 347-53.
115. Jasper, M.J., K.P. Tremellen, and S.A. Robertson, *Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of the T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue.* Mol Hum Reprod, 2006. **12**(5): p. 301-8.
116. Wang, W.J., et al., *Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients.* J Reprod Immunol, 2010. **84**(2): p. 164-70.

117. Saifi, B., et al., *Th17 cells and related cytokines in unexplained recurrent spontaneous miscarriage at the implantation window*. *Reprod Biomed Online*, 2014. **29**(4): p. 481-9.
118. Revel, A., *Defective endometrial receptivity*. *Fertil Steril*, 2012. **97**(5): p. 1028-32.
119. Lessey, B.A. and S.L. Young, *What exactly is endometrial receptivity?* *Fertil Steril*, 2019. **111**(4): p. 611-617.
120. Noyes, R.W., A.T. Hertig, and J. Rock, *Reprint of: Dating the Endometrial Biopsy*. *Fertil Steril*, 2019. **112**(4S1): p. e93-e115.
121. Vander Borcht, M. and C. Wyns, *Fertility and infertility: Definition and epidemiology*. *Clin Biochem*, 2018. **62**: p. 2-10.
122. Inhorn, M.C. and P. Patrizio, *Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century*. *Hum Reprod Update*, 2015. **21**(4): p. 411-26.
123. Fragouli, E. and D. Wells, *Aneuploidy in the human blastocyst*. *Cytogenet Genome Res*, 2011. **133**(2-4): p. 149-59.
124. Olivennes, F., A. Hazout, and R. Frydman, *Assistance médicale à la procréation*. 2 ed. 2002, Paris 194.
125. Cooper, T.G., et al., *World Health Organization reference values for human semen characteristics*. *Hum Reprod Update*, 2010. **16**(3): p. 231-45.
126. Ferraretti, A.P., et al., *ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria*. *Hum Reprod*, 2011. **26**(7): p. 1616-24.
127. Schimberni, M., et al., *Natural-cycle in vitro fertilization in poor responder patients: a survey of 500 consecutive cycles*. *Fertil Steril*, 2009. **92**(4): p. 1297-301.
128. Pelinck, M.J., et al., *Cumulative pregnancy rates after three cycles of minimal stimulation IVF and results according to subfertility diagnosis: a multicentre cohort study*. *Hum Reprod*, 2006. **21**(9): p. 2375-83.
129. Lamazou, F., et al., *[Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology, risk factors, prevention, diagnosis and treatment]*. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 2011. **40**(7): p. 593-611.
130. Zegers-Hochschild, F., et al., *The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009*. *Hum Reprod*, 2009. **24**(11): p. 2683-7.
131. College van Geneesheren Reproductieve Geneeskunde, Collège de Médecins Médecine de la Reproduction, and C.o.P.o.R. Medicine, *IVF Report 2016 of the College of Physicians in Reproductive Medicine*. 2016, BELRAP. p. 146.
132. Pandian, Z., et al., *Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013(7): p. CD003416.
133. Scott, R.T., Jr., et al., *Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial*. *Fertil Steril*, 2013. **100**(3): p. 697-703.
134. De Geyter, C., et al., *ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE: The European IVF-monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)*. *Hum Reprod*, 2018. **33**(9): p. 1586-1601.

135. Norwitz, E.R., V. Edusa, and J.S. Park, *Maternal physiology and complications of multiple pregnancy*. Semin Perinatol, 2005. **29**(5): p. 338-48.
136. Collins, J., *Cost efficiency of reducing multiple births*. Reprod Biomed Online, 2007. **15 Suppl 3**: p. 35-9.
137. Patrizio, P. and D. Sakkas, *From oocyte to baby: a clinical evaluation of the biological efficiency of in vitro fertilization*. Fertil Steril, 2009. **91**(4): p. 1061-6.
138. Sakkas, D. and D.K. Gardner, *Noninvasive methods to assess embryo quality*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2005. **17**(3): p. 283-8.
139. Niederberger, C., et al., *Forty years of IVF*. Fertil Steril, 2018. **110**(2): p. 185-324 e5.
140. Paternot, G., et al., *Intra- and interobserver analysis in the morphological assessment of early stage embryos during an IVF procedure: a multicentre study*. Reprod Biol Endocrinol, 2011. **9**: p. 127.
141. Alpha Scientists in Reproductive, M. and E.S.I.G.o. Embryology, *The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting*. Hum Reprod, 2011. **26**(6): p. 1270-83.
142. Bracewell-Milnes, T., et al., *Metabolomics as a tool to identify biomarkers to predict and improve outcomes in reproductive medicine: a systematic review*. Hum Reprod Update, 2017. **23**(6): p. 723-736.
143. Hardarson, T., L. Van Landuyt, and G. Jones, *The blastocyst*. Hum Reprod, 2012. **27 Suppl 1**: p. i72-91.
144. Glujovsky, D., et al., *Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology*. Cochrane Database Syst Rev, 2016(6): p. CD002118.
145. Gardner, D.K., et al., *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. 4 ed. Vol. 1. 2012, Boca Raton.
146. Armstrong, S., et al., *Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction*. Cochrane Database Syst Rev, 2018. **5**: p. CD011320.
147. Coticchio, G., et al., *What criteria for the definition of oocyte quality?* Ann N Y Acad Sci, 2004. **1034**: p. 132-44.
148. Fragouli, E., M.D. Lalioti, and D. Wells, *The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility*. Hum Reprod Update, 2014. **20**(1): p. 1-11.
149. Stoop, D., et al., *Reproductive potential of a metaphase II oocyte retrieved after ovarian stimulation: an analysis of 23 354 ICSI cycles*. Hum Reprod, 2012. **27**(7): p. 2030-5.
150. Rienzi, L., G. Vajta, and F. Ubaldi, *Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature*. Hum Reprod Update, 2011. **17**(1): p. 34-45.
151. Balaban, B. and B. Urman, *Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation*. Reprod Biomed Online, 2006. **12**(5): p. 608-15.
152. Hoshino, Y., *Updating the markers for oocyte quality evaluation: intracellular temperature as a new index*. Reprod Med Biol, 2018. **17**(4): p. 434-441.
153. Da Broi, M.G., et al., *Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications*. J Assist Reprod Genet, 2018. **35**(5): p. 735-751.
154. Uyar, A., S. Torrealday, and E. Seli, *Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality*. Fertil Steril, 2013. **99**(4): p. 979-97.

155. Huang, Z. and D. Wells, *The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome*. Mol Hum Reprod, 2010. **16**(10): p. 715-25.
156. Hamel, M., et al., *Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes*. Hum Reprod, 2008. **23**(5): p. 1118-27.
157. Adriaenssens, T., et al., *Cumulus-corona gene expression analysis combined with morphological embryo scoring in single embryo transfer cycles increases live birth after fresh transfer and decreases time to pregnancy*. J Assist Reprod Genet, 2019. **36**(3): p. 433-443.
158. Dumesic, D.A., et al., *Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health*. Fertil Steril, 2015. **103**(2): p. 303-16.
159. McCallie, B.R., et al., *Unique cumulus cell microRNA expression profiles predict IVF outcome and live birth*. Fertil Steril, 2012. **98**(3): p. S18.
160. Desquirit-Dumas, V., et al., *The mitochondrial DNA content of cumulus granulosa cells is linked to embryo quality*. Hum Reprod, 2017. **32**(3): p. 607-614.
161. Ogino, M., et al., *Mitochondrial DNA copy number in cumulus cells is a strong predictor of obtaining good-quality embryos after IVF*. J Assist Reprod Genet, 2016. **33**(3): p. 367-371.
162. Rodgers, R.J. and H.F. Irving-Rodgers, *Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid*. Biol Reprod, 2010. **82**(6): p. 1021-9.
163. Revelli, A., et al., *Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics*. Reprod Biol Endocrinol, 2009. **7**: p. 40.
164. Bianchi, L., et al., *Protein pathways working in human follicular fluid: the future for tailored IVF?* Expert Rev Mol Med, 2016. **18**: p. e9.
165. Andronico, F., et al., *Extracellular Vesicles in Human Oogenesis and Implantation*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(9).
166. de los Santos, M.J., et al., *Hormonal and molecular characterization of follicular fluid, cumulus cells and oocytes from pre-ovulatory follicles in stimulated and unstimulated cycles*. Hum Reprod, 2012. **27**(6): p. 1596-605.
167. Ciepiela, P., et al., *Vitamin D as a follicular marker of human oocyte quality and a serum marker of in vitro fertilization outcome*. J Assist Reprod Genet, 2018. **35**(7): p. 1265-1276.
168. Scalici, E., et al., *Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality*. Hum Reprod, 2014. **29**(12): p. 2661-9.
169. Guan, Y., et al., *Cell-free DNA induced apoptosis of granulosa cells by oxidative stress*. Clin Chim Acta, 2017. **473**: p. 213-217.
170. Shen, X., et al., *Proteomic analysis of human follicular fluid associated with successful in vitro fertilization*. Reprod Biol Endocrinol, 2017. **15**(1): p. 58.
171. Chen, F., et al., *Follicular fluid biomarkers for human in vitro fertilization outcome: Proof of principle*. Proteome Sci, 2016. **14**: p. 17.
172. Pinero-Sagredo, E., et al., *NMR metabolic profile of human follicular fluid*. NMR Biomed, 2010. **23**(5): p. 485-95.
173. Wallace, M., et al., *An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome*. Fertil Steril, 2012. **97**(5): p. 1078-84 e1-8.
174. Montani, D.A., et al., *Understanding mechanisms of oocyte development by follicular fluid lipidomics*. J Assist Reprod Genet, 2019. **36**(5): p. 1003-1011.

175. Martinez, R.M., et al., *Extracellular microRNAs profile in human follicular fluid and IVF outcomes*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 17036.
176. Feng, R., et al., *MiRNA-320 in the human follicular fluid is associated with embryo quality in vivo and affects mouse embryonic development in vitro*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 8689.
177. Ledee, N., et al., *Impact of follicular G-CSF quantification on subsequent embryo transfer decisions: a proof of concept study*. Hum Reprod, 2013. **28**(2): p. 406-13.
178. Krisher, R.L., W.B. Schoolcraft, and M.G. Katz-Jaffe, *Omics as a window to view embryo viability*. Fertil Steril, 2015. **103**(2): p. 333-341.
179. Uyar, A. and E. Seli, *Metabolomic assessment of embryo viability*. Semin Reprod Med, 2014. **32**(2): p. 141-52.
180. Iles, R.K., et al., *Secretome profile selection of optimal IVF embryos by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*. J Assist Reprod Genet, 2019. **36**(6): p. 1153-1160.
181. Foresta, C., et al., *Early protein profile of human embryonic secretome*. Front Biosci (Landmark Ed), 2016. **21**: p. 620-34.
182. Nyalwidhe, J., et al., *The search for biomarkers of human embryo developmental potential in IVF: a comprehensive proteomic approach*. Mol Hum Reprod, 2013. **19**(4): p. 250-63.
183. Hardarson, T., et al., *Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial*. Hum Reprod, 2012. **27**(1): p. 89-96.
184. Vergouw, C.G., et al., *Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial*. Hum Reprod, 2012. **27**(8): p. 2304-11.
185. Sfontouris, I.A., et al., *Non-invasive metabolomic analysis using a commercial NIR instrument for embryo selection*. J Hum Reprod Sci, 2013. **6**(2): p. 133-9.
186. Liang, B., et al., *Raman profiling of embryo culture medium to identify aneuploid and euploid embryos*. Fertil Steril, 2019. **111**(4): p. 753-762 e1.
187. Rosenbluth, E.M., et al., *Human embryos secrete microRNAs into culture media--a potential biomarker for implantation*. Fertil Steril, 2014. **101**(5): p. 1493-500.
188. Capalbo, A., et al., *MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophoctoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment*. Fertil Steril, 2016. **105**(1): p. 225-35 e1-3.
189. Abu-Halima, M., et al., *Micro-ribonucleic acids and extracellular vesicles repertoire in the spent culture media is altered in women undergoing In Vitro Fertilization*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 13525.
190. Pallinger, E., et al., *A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 39927.
191. Rubio, C., et al., *Embryonic cell-free DNA versus trophoctoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications*. Fertil Steril, 2019. **112**(3): p. 510-519.
192. Stigliani, S., et al., *Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome*. Mol Hum Reprod, 2014. **20**(12): p. 1238-46.
193. Magli, M.C., et al., *Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophoctoderm cells, or blastocoelic fluid?* Fertil Steril, 2016. **105**(3): p. 676-683 e5.

194. Leaver, M. and D. Wells, *Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics?* Hum Reprod Update, 2020. **26**(1): p. 16-42.
195. D'Alessandro, A., et al., *A mass spectrometry-based targeted metabolomics strategy of human blastocoele fluid: a promising tool in fertility research.* Mol Biosyst, 2012. **8**(4): p. 953-8.
196. Tedeschi, G., et al., *Proteomic profile of maternal-aged blastocoele fluid suggests a novel role for ubiquitin system in blastocyst quality.* J Assist Reprod Genet, 2017. **34**(2): p. 225-238.
197. Poli, M., et al., *Characterization and quantification of proteins secreted by single human embryos prior to implantation.* EMBO Mol Med, 2015. **7**(11): p. 1465-79.
198. Battaglia, R., et al., *Identification of extracellular vesicles and characterization of miRNA expression profiles in human blastocoele fluid.* Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 84.
199. Scott, R.T., Jr., et al., *Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective, blinded, nonselection study.* Fertil Steril, 2012. **97**(4): p. 870-5.
200. Menasha, J., et al., *Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study.* Genet Med, 2005. **7**(4): p. 251-63.
201. Practice Committees of the American Society for Reproductive, M., et al., *The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion.* Fertil Steril, 2018. **109**(3): p. 429-436.
202. Mastenbroek, S., et al., *Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs.* Hum Reprod Update, 2011. **17**(4): p. 454-66.
203. Scott, R.T., Jr., et al., *Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial.* Fertil Steril, 2013. **100**(3): p. 624-30.
204. Dahdouh, E.M., J. Balayla, and J.A. Garcia-Velasco, *Comprehensive chromosome screening improves embryo selection: a meta-analysis.* Fertil Steril, 2015. **104**(6): p. 1503-12.
205. Coates, A., et al., *Optimal euploid embryo transfer strategy, fresh versus frozen, after preimplantation genetic screening with next generation sequencing: a randomized controlled trial.* Fertil Steril, 2017. **107**(3): p. 723-730 e3.
206. Verpoest, W., et al., *Preimplantation genetic testing for aneuploidy by microarray analysis of polar bodies in advanced maternal age: a randomized clinical trial.* Hum Reprod, 2018. **33**(9): p. 1767-1776.
207. Rodriguez-Purata, J., et al., *Reproductive outcome is optimized by genomic embryo screening, vitrification, and subsequent transfer into a prepared synchronous endometrium.* J Assist Reprod Genet, 2016. **33**(3): p. 401-412.
208. Forman, E.J., et al., *In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial.* Fertil Steril, 2013. **100**(1): p. 100-7 e1.
209. Rubio, C., et al., *In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study.* Fertil Steril, 2017. **107**(5): p. 1122-1129.
210. Yang, Z., et al., *Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study.* Mol Cytogenet, 2012. **5**(1): p. 24.

211. Munne, S., et al., *Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good-prognosis patients: a multicenter randomized clinical trial*. Fertil Steril, 2019.
212. Cecchino, G.N., et al., *The role of mitochondrial activity in female fertility and assisted reproductive technologies: overview and current insights*. Reprod Biomed Online, 2018. **36**(6): p. 686-697.
213. Skowronska, P., et al., *Follicular fat-soluble vitamins as markers of oocyte competency*. Syst Biol Reprod Med, 2020: p. 1-10.
214. Fragouli, E., et al., *Clinical implications of mitochondrial DNA quantification on pregnancy outcomes: a blinded prospective non-selection study*. Hum Reprod, 2017. **32**(11): p. 2340-2347.
215. Nicola, N.A., et al., *Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor*. J Biol Chem, 1983. **258**(14): p. 9017-23.
216. Nagata, S., et al., *Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor*. Nature, 1986. **319**(6052): p. 415-8.
217. Simmers, R.N., et al., *Localization of the G-CSF gene on chromosome 17 proximal to the breakpoint in the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia*. Blood, 1987. **70**(1): p. 330-2.
218. Metcalf, D., *The colony-stimulating factors and cancer*. Cancer Immunol Res, 2013. **1**(6): p. 351-6.
219. Demetri, G.D. and J.D. Griffin, *Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor*. Blood, 1991. **78**(11): p. 2791-808.
220. Franzke, A., *The role of G-CSF in adaptive immunity*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(4): p. 235-44.
221. Wurfel, W., *Treatment with granulocyte colony-stimulating factor in patients with repetitive implantation failures and/or recurrent spontaneous abortions*. J Reprod Immunol, 2015. **108**: p. 123-35.
222. Shorter, S.C., G.S. Vince, and P.M. Starkey, *Production of granulocyte colony-stimulating factor at the materno-foetal interface in human pregnancy*. Immunology, 1992. **75**(3): p. 468-74.
223. Miyama, M., N. Umesaki, and M. Kawabata, *Identification of the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) producing cell population in human decidua and its biological action on trophoblast cell*. Osaka City Med J, 1998. **44**(1): p. 85-96.
224. Salmassi, A., et al., *Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells*. Fertil Steril, 2004. **81 Suppl 1**: p. 786-91.
225. Vandermolen, D.T. and 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, 1996. **36**(5): p. 278-84.
226. Bendall, L.J. and K.F. Bradstock, *G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent*. Cytokine Growth Factor Rev, 2014. **25**(4): p. 355-67.
227. Lieschke, G.J., et al., *Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization*. Blood, 1994. **84**(6): p. 1737-46.
228. Metcalf, D., *The colony-stimulating factors and cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(6): p. 425-34.

229. Rutella, S., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7085-91.
230. Schlahsa, L., et al., *Granulocyte-colony-stimulatory factor: a strong inhibitor of natural killer cell function*. Transfusion, 2011. **51**(2): p. 293-305.
231. Tweardy, D.J., 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, 1992. **79**(5): p. 1148-54.
232. Larsen, A., 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, 1990. **172**(6): p. 1559-70.
233. van de Geijn, G.J., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal hematopoietic cell development and myeloid disease*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2003. **149**: p. 53-71.
234. McCracken, S., et al., *Expression of granulocyte-colony stimulating factor and its receptor is regulated during the development of the human placenta*. J Endocrinol, 1996. **149**(2): p. 249-58.
235. Uzumaki, H., 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, 1989. **86**(23): p. 9323-6.
236. Calhoun, D.A. and R.D. Christensen, *Human developmental biology of granulocyte colony-stimulating factor*. Clin Perinatol, 2000. **27**(3): p. 559-76, vi.
237. Rahmati, M., et al., *Colony Stimulating Factors 1, 2, 3 and early pregnancy steps: from bench to bedside*. J Reprod Immunol, 2015. **109**: p. 1-6.
238. Eftekhari, M., E. Naghshineh, and P. Khani, *Role of granulocyte colony-stimulating factor in human reproduction*. J Res Med Sci, 2018. **23**: p. 7.
239. Robert, C.A., et al., *Mediator in the Embryo-endometrium Cross-talk: Granulocyte Colony-stimulating Factor in Infertility*. Cureus, 2019. **11**(8): p. e5390.
240. Zhang, L., et al., *Therapeutic role of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for infertile women under in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) treatment: a meta-analysis*. Arch Gynecol Obstet, 2018. **298**(5): p. 861-871.
241. Makinoda, S., et al., *Erythropoietin, granulocyte-colony stimulating factor, interleukin-1 beta and interleukin-6 during the normal menstrual cycle*. Int J Gynaecol Obstet, 1996. **55**(3): p. 265-71.
242. Salmassi, A., et al., *Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome?* Hum Reprod, 2005. **20**(9): p. 2434-40.
243. Hock, D.L., R.D. Huhn, and E. Kemmann, *Leukocytosis in response to exogenous gonadotrophin stimulation*. Hum Reprod, 1997. **12**(10): p. 2143-6.
244. Giuliani, A., et al., *Polymorphonuclear leukocyte function during the menstrual cycle and during controlled ovarian hyperstimulation*. Fertil Steril, 2004. **82**(6): p. 1711-3.
245. Yanagi, K., 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, 2002. **17**(12): p. 3046-52.
246. Fujii, R., et al., *The involvement of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in the release of a mature oocyte*. Human Reproduction, 2011. **26** (Suppl.1): p. 310-311.
247. Makinoda, S., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in the mechanism of human ovulation and its clinical usefulness*. Curr Med Chem, 2008. **15**(6): p. 604-13.

248. Shibata, T., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor as a potential inducer of ovulation in infertile women with luteinized unruptured follicle syndrome*. *Transl Res*, 2016. **171**: p. 63-70.
249. Ledee, N., 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*, 2011. **95**(1): p. 94-8.
250. Ledee, N., et al., *Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor*. *Hum Reprod*, 2008. **23**(9): p. 2001-9.
251. Ledee, N., et al., *New pre-conception immune biomarkers for clinical practice: interleukin-18, interleukin-15 and TWEAK on the endometrial side, G-CSF on the follicular side*. *J Reprod Immunol*, 2011. **88**(2): p. 118-23.
252. Ledee, N., et al., *Performance evaluation of microbead and ELISA assays for follicular G-CSF: a non-invasive biomarker of oocyte developmental competence for embryo implantation*. *J Reprod Immunol*, 2010. **86**(2): p. 126-32.
253. Gaafar, T.M., et al., *Evaluation of cytokines in follicular fluid and their effect on fertilization and pregnancy outcome*. *Immunol Invest*, 2014. **43**(6): p. 572-84.
254. Niu, Z., et al., *Follicular fluid cytokine composition and oocyte quality of polycystic ovary syndrome patients with metabolic syndrome undergoing in vitro fertilization*. *Cytokine*, 2017. **91**: p. 180-186.
255. Makinoda, S., et al., *Serum concentration of endogenous G-CSF in women during the menstrual cycle and pregnancy*. *Eur J Clin Invest*, 1995. **25**(11): p. 877-9.
256. Duan, J.S., *Production of granulocyte colony stimulating factor in decidual tissue and its significance in pregnancy*. *Osaka City Med J*, 1990. **36**(2): p. 81-97.
257. Liu, K.E., et al., *The impact of a thin endometrial lining on fresh and frozen-thaw IVF outcomes: an analysis of over 40 000 embryo transfers*. *Hum Reprod*, 2018. **33**(10): p. 1883-1888.
258. Liu, K.E., M. Hartman, and A. Hartman, *Management of thin endometrium in assisted reproduction: a clinical practice guideline from the Canadian Fertility and Andrology Society*. *Reprod Biomed Online*, 2019. **39**(1): p. 49-62.
259. Kasius, A., et al., *Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: a systematic review and meta-analysis*. *Hum Reprod Update*, 2014. **20**(4): p. 530-41.
260. Lebovitz, O. and R. Orvieto, *Treating patients with "thin" endometrium - an ongoing challenge*. *Gynecol Endocrinol*, 2014. **30**(6): p. 409-14.
261. Gleicher, N., A. Vidali, and D.H. Barad, *Successful treatment of unresponsive thin endometrium*. *Fertil Steril*, 2011. **95**(6): p. 2123 e13-7.
262. Gleicher, N., et al., *A pilot cohort study of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of unresponsive thin endometrium resistant to standard therapies*. *Hum Reprod*, 2013. **28**(1): p. 172-7.
263. Lucena, E. and H. Moreno-Ortiz, *Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): a mediator in endometrial receptivity for a patient with polycystic ovary (PCO) undergoing in vitro maturation (IVM)*. *BMJ Case Rep*, 2013. **2013**.
264. Kunicki, M., et al., *Evaluation of granulocyte colony-stimulating factor effects on treatment-resistant thin endometrium in women undergoing in vitro fertilization*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 913235.
265. Tehraninejad, E., et al., *G-CSF Intrauterine for Thin Endometrium, and Pregnancy Outcome*. *J Family Reprod Health*, 2015. **9**(3): p. 107-12.

266. Mishra, V.V., et al., *Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) on Persistent Thin Endometrium in Frozen Embryo Transfer (FET) Cycles*. J Obstet Gynaecol India, 2016. **66**(Suppl 1): p. 407-11.
267. Lee, D., et al., *The efficacy of intrauterine instillation of granulocyte colony-stimulating factor in infertile women with a thin endometrium: A pilot study*. Clin Exp Reprod Med, 2016. **43**(4): p. 240-246.
268. Xu, B., et al., *Two protocols to treat thin endometrium with granulocyte colony-stimulating factor during frozen embryo transfer cycles*. Reprod Biomed Online, 2015. **30**(4): p. 349-58.
269. Sarvi, F., et al., *Effect of Increased Endometrial Thickness and Implantation Rate by Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Unresponsive Thin Endometrium in Fresh In Vitro Fertilization Cycles: A Randomized Clinical Trial*. Obstet Gynecol Int, 2017. **2017**: p. 3596079.
270. Eftekhari, M., M. Sayadi, and F. Arabjehvani, *Transvaginal perfusion of G-CSF for infertile women with thin endometrium in frozen ET program: A non-randomized clinical trial*. Iran J Reprod Med, 2014. **12**(10): p. 661-6.
271. Li, Y., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor administration for infertile women with thin endometrium in frozen embryo transfer program*. Reprod Sci, 2014. **21**(3): p. 381-5.
272. Check, J.H., R. Cohen, and J.K. Choe, *Failure to improve a thin endometrium in the late proliferative phase with uterine infusion of granulocyte-colony stimulating factor*. Clin Exp Obstet Gynecol, 2014. **41**(4): p. 473-5.
273. Kamath, M.S., et al., *Use of granulocyte-colony stimulating factor in assisted reproductive technology: A systematic review and meta-analysis*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2017. **214**: p. 16-24.
274. Li, J., S. Mo, and Y. Chen, *The effect of G-CSF on infertile women undergoing IVF treatment: A meta-analysis*. Syst Biol Reprod Med, 2017. **63**(4): p. 239-247.
275. Xie, Y., et al., *Efficacy of intrauterine perfusion of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for Infertile women with thin endometrium: A systematic review and meta-analysis*. Am J Reprod Immunol, 2017. **78**(2).
276. Zhao, J., et al., *Whether G-CSF administration has beneficial effect on the outcome after assisted reproductive technology? A systematic review and meta-analysis*. Reprod Biol Endocrinol, 2016. **14**(1): p. 62.
277. Barad, D.H., 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, 2014. **101**(3): p. 710-5.
278. Eftekhari, M., et al., *Effect of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) on IVF outcomes in infertile women: An RCT*. Int J Reprod Biomed (Yazd), 2016. **14**(5): p. 341-6.
279. Zhao, J., et al., *Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of thin endometrium in experimental rats*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82375.
280. RPL, E.G.G.o., et al., *ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss*. Hum Reprod Open, 2018. **2018**(2): p. hoy004.
281. Practice Committee of American Society for Reproductive, M., *Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion*. Fertil Steril, 2013. **99**(1): p. 63.
282. Rai, R. and L. Regan, *Recurrent miscarriage*. Lancet, 2006. **368**(9535): p. 601-11.

283. Scarpellini, F. and M. Sbracia, *Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomised controlled trial.* Hum Reprod, 2009. **24**(11): p. 2703-8.
284. Coughlan, C., et al., *Recurrent implantation failure: definition and management.* Reprod Biomed Online, 2014. **28**(1): p. 14-38.
285. Rahmati, M., et al., *Granulocyte-Colony Stimulating Factor related pathways tested on an endometrial ex-vivo model.* PLoS One, 2014. **9**(9): p. e102286.
286. Stern, C., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of heparin and aspirin for women with in vitro fertilization implantation failure and antiphospholipid or antinuclear antibodies.* Fertil Steril, 2003. **80**(2): p. 376-83.
287. Zeyneloglu, H.B. and G. Onalan, *Remedies for recurrent implantation failure.* Semin Reprod Med, 2014. **32**(4): p. 297-305.
288. Orvieto, R., M. Brengauz, and B. Feldman, *A novel approach to normal responder patient with repeated implantation failures--a case report.* Gynecol Endocrinol, 2015. **31**(6): p. 435-7.
289. Bashiri, A., K.I. Halper, and R. Orvieto, *Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions.* Reprod Biol Endocrinol, 2018. **16**(1): p. 121.
290. Tan, B.K., et al., *Investigation and current management of recurrent IVF treatment failure in the UK.* BJOG, 2005. **112**(6): p. 773-80.
291. Margalioth, E.J., et al., *Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET.* Hum Reprod, 2006. **21**(12): p. 3036-43.
292. Wurfel, W., et al., *High pregnancy rates with administration of granulocyte colony-stimulating factor in ART-patients with repetitive implantation failure and lacking killer-cell immunoglobulin-like receptors.* Hum Reprod, 2010. **25**(8): p. 2151-2; author reply 2152.
293. Hiby, S.E., et al., *Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage.* Hum Reprod, 2008. **23**(4): p. 972-6.
294. Eftekhari, M., et al., *Efficacy of Intrauterine infusion of granulocyte colony stimulating factor on patients with history of implantation failure: A randomized control trial.* Int J Reprod Biomed (Yazd), 2016. **14**(11): p. 687-690.
295. Davari-Tanha, F., et al., *The role of G-CSF in recurrent implantation failure: A randomized double blind placebo control trial.* Int J Reprod Biomed (Yazd), 2016. **14**(12): p. 737-742.
296. Arefi, S., et al., *Granulocyte-colony stimulating factor may improve pregnancy outcome in patients with history of unexplained recurrent implantation failure: An RCT.* Int J Reprod Biomed (Yazd), 2018. **16**(5): p. 299-304.
297. Aleyasin, A., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor in repeated IVF failure, a randomized trial.* Reproduction, 2016. **151**(6): p. 637-42.
298. Scarpellini, F. and M. Sbracia, *G-CSF treatment improves IVF outcome in women with recurrent implantation failure in IVF.* Journal of Reproductive Immunology, 2012. **94**: p. 103.
299. Obidniak, D., et al., *Effect of colony-stimulating growth factor on outcome of frozen-thawed embryo transfer in patients with repeated implantation failure.* Fertil Steril, 2016. **106**(3): p. e134.
300. Skaznik-Wikiel, M.E., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor in conjunction with vascular endothelial growth factor maintains primordial follicle numbers in transplanted mouse ovaries.* Fertil Steril, 2011. **95**(4): p. 1405-9.

301. Skaznik-Wikiel, M.E., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor with or without stem cell factor extends time to premature ovarian insufficiency in female mice treated with alkylating chemotherapy*. Fertil Steril, 2013. **99**(7): p. 2045-54 e3.
302. Pala, H.G., et al., *The protective effect of granulocyte colony-stimulating factor on endometrium and ovary in a rat model of diabetes mellitus*. Gynecol Obstet Invest, 2014. **78**(2): p. 94-100.
303. Aapro, M.S., et al., *2010 update of EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphoproliferative disorders and solid tumours*. Eur J Cancer, 2011. **47**(1): p. 8-32.
304. Crawford, J., et al., *Hematopoietic growth factors: ESMO Clinical Practice Guidelines for the applications*. Ann Oncol, 2010. **21 Suppl 5**: p. v248-51.
305. Pessach, I., A. Shimoni, and A. Nagler, *Granulocyte-colony stimulating factor for hematopoietic stem cell donation from healthy female donors during pregnancy and lactation: what do we know?* Hum Reprod Update, 2013. **19**(3): p. 259-67.
306. Elyce Cardonick, F.I., Natalie Torres, *The Use of Neupogen (Filgrastim) or Neulasta (Pegfilgrastim) during Pregnancy When Chemotherapy Is Indicated for Maternal Cancer Treatment*. Journal of Cancer Therapy, 2012. **3**: p. 157-161.
307. Dale, D.C., et al., *Severe chronic neutropenia: treatment and follow-up of patients in the Severe Chronic Neutropenia International Registry*. Am J Hematol, 2003. **72**(2): p. 82-93.
308. Boxer, L.A., et al., *Use of granulocyte colony-stimulating factor during pregnancy in women with chronic neutropenia*. Obstet Gynecol, 2015. **125**(1): p. 197-203.
309. Zeidler, C., et al., *Outcome and management of pregnancies in severe chronic neutropenia patients by the European Branch of the Severe Chronic Neutropenia International Registry*. Haematologica, 2014. **99**(8): p. 1395-402.
310. Santjohanser, C., et al., *Granulocyte-colony stimulating factor as treatment option in patients with recurrent miscarriage*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2013. **61**(2): p. 159-64.
311. Rienzi, L., et al., *Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer*. Hum Reprod, 2002. **17**(7): p. 1852-5.
312. de los Santos, M.J., et al., *Implantation rates after two, three, or five days of embryo culture*. Placenta, 2003. **24 Suppl B**: p. S13-9.
313. Wong, K.M., S. Repping, and S. Mastenbroek, *Limitations of embryo selection methods*. Semin Reprod Med, 2014. **32**(2): p. 127-33.
314. De Vos, A., et al., *Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers*. Hum Reprod, 2009. **24**(12): p. 2988-96.
315. Munne, S. and D. Wells, *Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing*. Fertil Steril, 2017. **107**(5): p. 1085-1091.
316. Harper, J., et al., *When and how should new technology be introduced into the IVF laboratory?* Hum Reprod, 2012. **27**(2): p. 303-13.
317. Munne, S., et al., *Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing*. Fertil Steril, 2017. **108**(1): p. 62-71 e8.

318. Uyar, A. and E. Seli, *Embryo assessment strategies and their validation for clinical use: a critical analysis of methodology*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2012. **24**(3): p. 141-50.
319. Kung, A., et al., *Validation of next-generation sequencing for comprehensive chromosome screening of embryos*. Reprod Biomed Online, 2015. **31**(6): p. 760-9.
320. Huang, J., et al., *Validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of blastocysts*. Fertil Steril, 2016. **105**(6): p. 1532-6.
321. Seli, E., et al., *Receiver operating characteristic (ROC) analysis of day 5 morphology grading and metabolomic Viability Score on predicting implantation outcome*. J Assist Reprod Genet, 2011. **28**(2): p. 137-44.
322. Kahyaoglu, I., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor: A relation between serum and follicular fluid levels and in-vitro fertilization outcome in patients with polycystic ovary syndrome*. Cytokine, 2015. **74**(1): p. 113-116.
323. Tournaye, H., et al., *Clinical performance of a specific granulocyte colony stimulating factor ELISA to determine its concentration in follicular fluid as a predictor of implantation success during in vitro fertilization*. Gynecol Endocrinol, 2019: p. 1-5.
324. Noel, L., et al., *Absence of correlation between follicular fluid volume and follicular granulocyte colony-stimulating factor, a predictor of embryo implantation and successful delivery*. Gynecol Endocrinol, 2019: p. 1-5.
325. Hill, M.J. and E.D. Levens, *Is there a benefit in follicular flushing in assisted reproductive technology?* Curr Opin Obstet Gynecol, 2010. **22**(3): p. 208-12.
326. Georgiou, E.X., et al., *Follicular flushing during oocyte retrieval in assisted reproductive techniques*. Cochrane Database Syst Rev, 2018. **4**: p. CD004634.
327. Wirleitner, B., et al., *Relationship between follicular volume and oocyte competence, blastocyst development and live-birth rate: optimal follicle size for oocyte retrieval*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2018. **51**(1): p. 118-125.
328. Adriaenssens, T., et al., *Cumulus cell gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics*. Hum Reprod, 2010. **25**(5): p. 1259-70.
329. Grondahl, M.L., 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, 2009. **91**(5): p. 1820-30.
330. Kirkegaard, K., et al., *Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology*. Fertil Steril, 2015. **103**(2): p. 323-32.
331. Sarapik, A., et al., *Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 606459.
332. Cobo, A., et al., *Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles*. Fertil Steril, 2012. **98**(5): p. 1138-46 e1.
333. Roque, M., et al., *Fresh versus elective frozen embryo transfer in IVF/ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes*. Hum Reprod Update, 2019. **25**(1): p. 2-14.
334. Lukassen, H.G., et al., *Cost analysis of singleton versus twin pregnancies after in vitro fertilization*. Fertil Steril, 2004. **81**(5): p. 1240-6.

335. Cai, L., et al., *The effects of human recombinant granulocyte-colony stimulating factor treatment during in vitro maturation of porcine oocyte on subsequent embryonic development*. Theriogenology, 2015. **84**(7): p. 1075-87.
336. Ziebe, S., et al., *A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization*. Fertil Steril, 2013. **99**(6): p. 1600-9.
337. Tevkin, S., et al., *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*. Gynecol Endocrinol, 2014. **30 Suppl 1**: p. 9-12.
338. Munne, S., et al., *Self-correction of chromosomally abnormal embryos in culture and implications for stem cell production*. Fertil Steril, 2005. **84**(5): p. 1328-34.
339. Yannaki, E., 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, 2005. **33**(1): p. 108-19.
340. Klocke, R., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for cardio- and cerebrovascular regenerative applications*. Curr Med Chem, 2008. **15**(10): p. 968-77.
341. Xiao, B.G., C.Z. Lu, and H. Link, *Cell biology and clinical promise of G-CSF: immunomodulation and neuroprotection*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(6): p. 1272-90.
342. Tanaka, T., et al., *Production and physiological function of granulocyte colony-stimulating factor in non-pregnant human endometrial stromal cells*. Gynecol Endocrinol, 2000. **14**(6): p. 399-404.
343. Gargett, C.E. and L. Ye, *Endometrial reconstruction from stem cells*. Fertil Steril, 2012. **98**(1): p. 11-20.
344. Aligeti, S., et al., *Colony-stimulating factor-1 exerts direct effects on the proliferation and invasiveness of endometrial epithelial cells*. Fertil Steril, 2011. **95**(8): p. 2464-6.
345. Franasiak, J.M. and R.T. Scott, *Contribution of immunology to implantation failure of euploid embryos*. Fertil Steril, 2017. **107**(6): p. 1279-1283.
346. Saito, S., et al., *What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy?* J Assist Reprod Genet, 2007. **24**(9): p. 379-86.
347. Sugita, K., et al., *Granulocyte colony stimulation factor (G-CSF) suppresses interleukin (IL)-12 and/or IL-2 induced interferon (IFN)-gamma production and cytotoxicity of decidual mononuclear cells*. Am J Reprod Immunol, 2003. **50**(1): p. 83-9.
348. Herrler, A., U. von Rango, and H.M. Beier, *Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation*. Reprod Biomed Online, 2003. **6**(2): p. 244-56.
349. McCracken, S.A., et al., *Gestational regulation of granulocyte-colony stimulating factor receptor expression in the human placenta*. Biol Reprod, 1999. **60**(4): p. 790-6.
350. Lagadari, M., et al., *Analysis of macrophage presence in murine placenta: influence of age and parity status*. Am J Reprod Immunol, 2004. **51**(1): p. 49-55.
351. Litwin, S., et al., *Comparative immunohistochemical study of M-CSF and G-CSF in feto-maternal interface in a multiparity mouse model*. Am J Reprod Immunol, 2005. **54**(5): p. 311-20

