UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2011 N° 109

MEMOIRE

DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE

BIOLOGIE MEDICALE

Muriel QUIGNARD-LOPES

Née le 15 Janvier 1981

Présenté et soutenu publiquement le 21 Octobre 2011

Conformément au décret n° 2003-76 du
23 Janvier 2003 tient lieu de

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN MEDECINE

EVALUATION DE LA PROSTAGLANDINE E2 FOLLICULAIRE COMME MARQUEUR DE QUALITE OVOCYTAIRE AU COURS DE TENTATIVES DE FECONDATION IN VITRO

Président : Monsieur le Professeur Paul BARRIERE
Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Damien MASSON
Membres du jury : Monsieur le Professeur Dominique LE LANNOU
Madame le Professeur Berthe-Marie IMBERT

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS **5**

LISTE DES FIGURES **6**

LISTE DES TABLEAUX **8**

INTRODUCTION **9**

GENERALITES **11**

1. Fertilité et qualité ovocytaire **11**

2. De l'ovogonie à l'ovocyte II : L'Ovogenèse **13**

2.1. La croissance folliculaire basale 14

2.2. La croissance folliculaire terminale 16

3. Formation et composition du liquide folliculaire **18**

4. Les facteurs de régulation de la folliculogénèse **20**

4.1. Régulation par les gonadotrophines 20

4.2. Régulation intra-folliculaire de la stéroïdogénèse 21

5. Relation paracrine ovocyte/cellules somatiques **23**

5.1. Les bases de la relation paracrine 23

5.2. Les bases physiques du dialogue ovocyte/cellules somatiques 23

6. Les Facteurs Ovocytaires : BMP 15 et GDF-9 ..... **25**

6.1. Voies de signalisation du GDF-9 et du BMP-15 26

6.2. Relations GDF-9/BMP-15 26

6.3. Rôles du GDF-9 au cours de la croissance folliculaire précoce 28

6.4. Rôles du GDF-9 pendant la période péri-ovulatoire 29

6.5. Relation avec la qualité ovocytaire et embryonnaire 31

7. La PGE2 : un médiateur lipidique de la relation paracrine ovocyte-cumulus. **32**

7.1. Historique 32

7.2. Précurseurs et voies de synthèse des prostaglandines 33

7.3. Voie de synthèse de la PGE2 35

7.3.1. Les cyclo-oxygénases 35

7.3.2. Les prostaglandines E synthases 37

7.4. Transport et métabolisme de la PGE2 ... 39
7.5. Récepteurs de la PGE2 et voies de signalisation intracellulaires ... 39
7.6. Bases expérimentales déterminant le rôle de la PGE2 dans la folliculogénèse ... 43
7.6.1. Blocage de l'ovulation par l'inhibition de synthèse de PGE2 ... 43
7.6.2. Rupture folliculaire ... 44
7.6.3. Expansion du COC ... 44
7.6.4. Maturation méiotique ovocytaire et fécondation ... 44
8. La Progestérone : Partenaire de la PGE2 et mediateur de la relation paracrine ... 45

OBJECTIFS DE L'ETUDE ... 48

MATERIELS ET METHODES ... 49
1. Inclusion des patientes ... 49
1.1. Protocoles de stimulation ovarienne ... 49
1.2. Déclenchement de l'ovulation ... 50
2. Recueil des données relatives aux patientes ... 50
3. Recueil des échantillons ... 51
4. Extraction des prostaglandines ... 53
5. Dosage de la prostaglandine E2 ... 53
6. Dosage de la progestérone ... 55
7. Analyse statistique ... 55

RESULTATS ... 56
1. Analyse descriptive de la population étudiée ... 56
1.1. Caractéristiques cliniques et biologiques des patientes ... 56
1.2. Caractéristiques des cycles de stimulation ... 57
1.3. Caractéristiques des ICSI ... 59
1.4. Issues de stimulation ... 60
1.5. Comparaison des populations « grossesse évolutive » versus « absence de grossesse évolutive ... 61
2. Analyse des dosages de PGE2 et progestérone folliculaires ... 63
2.1. Analyse des concentrations en PGE2 et progestérone folliculaires en fonction des données clinico-biologiques des patientes. ... 63
2.2. Analyse des concentrations en PGE2 et progestérone folliculaires en fonction des caractéristiques des tentatives ... 65
2.3. Analyse des concentrations en PGE2 et progestérone folliculaires ... 67

2.4. Analyse des concentrations en PGE2 et progestérone folliculaires en fonction de la maturité ovocytaire 68
2.5. Analyse des concentrations en PGE2 et progestérone folliculaires en fonction de la fécondation ovocytaire 70
2.6. Analyse des concentrations en PGE2 et progestérone folliculaires en fonction de la qualité embryonnaire 72
2.7. Devenir des embryons issus des liquides folliculaires étudiés 74
2.8. Evolution de l'effectif en fonction des paramètres étudiés. 74

DISCUSSION 76

1. Analyse de la population étudiée 76
2. design de l'étude 77
3. Les marqueurs de qualité ovocytaire 79
4. La PGE2, acteur-clé de la qualité ovocytaire ? 84
5. Perspectives et Impact thérapeutique 91

CONCLUSION 94

BIBLIOGRAPHIE 94

ANNEXE 106

ABREVIATIONS

AA = Acide Arachidonique
AINS = Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens
AMH = Hormone Anti-Müllérienne
AMP = Assistance Médicale à la Procréation
BMI = Body Mass Index
BMP-15 = Bone Morphogenic Protein 15
CFA = Compte de Follicules Antraux
COC = Complexe Cumulo-Ovocytaire
COX = Cyclo-oxygénase
EGF = Epidermal Growth Factor
EIA = Enzyme Immuno Assay
FIV = Fécondation *in vitro*
FSH = Follicule-Stimulating Hormone
GDF-9 = Growth Differenciation Factor 9
GnRH = Gonadotropin Releasing Hormone
Has 2 = Hyaluronan synthase 2
hCG = human Chorionic Gonadotropin
HETE = Hydroxy Eicosatetraenoic acid
ICSI = Intracytoplasmic Sperm Injection
Ig = Immunoglobuline
IGF = Insulin Growth Factor
IL = Interleukine
IMC = Index de Masse Corporelle
IRT = Institut de Recherche Thérapeutique
LH = Luteinizing Hormone
LPS = Lipopolysaccharide
MIV = Maturation *in vitro*
MRP = Multidrug Resistant protein
OHSS = Ovarian Hyperstimulation Syndrome
OMS = Organisation Mondiale de la Santé
PG = Prostaglandine
PGE2 = Prostaglandine E2
PN = Pronucleus
TGF-β = Transforming Growth Factor β
UI = Unités Internationales

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principales étapes du développement folliculaire.....14

Figure 2 : Caractéristiques morphologiques des follicules au cours de la folliculogénèse.....15

Figure 3 : Aspect morphologique d'un follicule pré-ovulatoire.....17

Figure 4 : Mécanismes de formation du liquide folliculaire.....23

Figure 5 : Profil électrophorétique des protéines folliculaires.....20

Figure 6 : Principaux systèmes et facteurs impliqués dans la communication entre les 3 principaux types cellulaires du follicule ovarien.....22

Figure 7 : Voies de signalisation du GDF-9 et du BMP-15 et leurs rôles respectifs en période pré-ovulatoire.....27

Figure 8 : Modélisation des rôles du GDF-9 dans le follicule ovarien.....30

Figure 9 : Régulation des gènes-cibles du GDF-9 dans les cellules du cumulus.....31

Figure 10 : Transformation métabolique de l'acide arachidonique.....34

Figure 11 : Voie de biosynthèse des prostanoïdes à partir de l'acide arachidonique.....35

Figure 12 : Voie métabolique de synthèse de PGE2.....38

Figure 13 : Couplage enzymatique de COX2 et mPGES1.....38

Figure 14 : Schéma récapitulatif des voies de synthèse et de signalisation de la PGE2.....42

Figure 15 : Corrélation entre les concentrations folliculaires en PGE2 et progestérone.....67

Figure 16 : Répartition des ovocytes recueillis en fonction de la maturité ovocytaire.....68

Figure 17 : Concentrations folliculaires de PGE2 et de progestérone en fonction de la maturité des ovocytes recueillis.....69

Figure 18 : Répartition des ovocytes selon le statut de fécondation après micro-injection à J1....70

Figure 19 : Concentrations folliculaires de PGE2 et de progestérone en fonction du statut de fécondation à J1 des ovocytes micro-injectés 71

Figure 20 : Répartition des embryons en fonction de leur qualité à J2/J3 72

Figure 21 : Concentrations folliculaires en PGE2 et progestérone en fonction de la qualité embryonnaire à J2 ou J3.....73

Figure 22 : Représentation schématique de l'évolution de l'effectif en fonction des paramètres étudiés.....75

Figure 23 : Relations entre l'induction de COX2, la sécrétion de PGE2 et la durée du processus ovulatoire chez la rate, la vache et la jument dans le follicule préovulatoire.....87

Figure 24 : Hypothèse de régulation de la cinétique de la production folliculaire de PGE2 et son impact sur la maturation ovocytaire finale 89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Signaux de transduction par les récepteurs de PGE2.....40

Tableau II : Principales caractéristiques du PGE2 EIA Kit - Monoclonal.....54

Tableau III : Principales caractéristiques cliniques et biologiques des 18 patientes incluses dans l'étude. 57

Tableau IV : Caractéristiques de la stimulation ovarienne et de la réponse ovarienne pour les 18 patientes.....58

Tableau V : Caractéristiques des ICSI pour les 18 patientes. 59

Tableau VI : Caractéristiques des issues de stimulation pour les 18 patientes. 60

Tableau VII : Comparaison des groupes "grossesse" vs "absence de grossesse" 61

Tableau VIII : Analyse des concentrations folliculaires médianes en PGE2 et progestérone en fonction des données clinico-biologiques des patientes.....64

Tableau IX : Analyse des concentrations folliculaires médianes en PGE2 et progestérone en fonction des caractéristiques des tentatives d'ICSI. 65

Tableau X : Résultats des principales études ayant analysé un marqueur folliculaire.....83

INTRODUCTION

La qualité ovocytaire est un des éléments majeurs concourant au succès d'une tentative de Fécondation *in vitro* (FIV). Un des enjeux actuels importants de la Biologie et Médecine de la Reproduction est d'optimiser la stimulation ovarienne des femmes lors d'une tentative de Fécondation *in vitro*, afin d'obtenir une cohorte ovocytaire homogène et mature témoignant d'une bonne qualité ovocytaire et d'augmenter les chances de succès de cette tentative.

En effet, la qualité des ovocytes obtenus après stimulation ovarienne contrôlée lors d'un protocole de FIV varie considérablement. Seulement la moitié des ovocytes recueillis poursuivent un développement embryonnaire, et moins encore s'implantent. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement d'un ovocyte compétent pourrait guider le biologiste dans l'identification et la sélection des ovocytes les plus compétents, aptes à la fécondation et au développement embryonnaire.

Le liquide folliculaire est aisément accessible au cours de la ponction ovocytaire et représente une source potentielle de marqueurs de la qualité ovocytaire. En effet, les étapes permettant d'aboutir à un ovocyte mature sont sous la dépendance de facteurs endocrines, mais aussi locaux ou paracrines, sécrétés dans le liquide folliculaire.

Cette relation paracrine entre l'ovocyte et les cellules somatiques qui l'entourent met en jeu de nombreux facteurs. Plusieurs voies de signalisation activées par ces facteurs ont été mises en évidence. L'une des voies principales implique un facteur ovocytaire appartenant à la famille du Transforming Growth Factor-β (TGF-β), le Growth Differenciation Factor 9 (GDF-9), aboutissant à l'activation de plusieurs gènes au sein des cellules de la granulosa, dont la cyclo-oxygénase 2 (COX2), enzyme-clé permettant la sécrétion de la prostaglandine E2 (PGE2). La PGE2 est ainsi sécrétée dans le liquide folliculaire en période pré-ovulatoire et y joue un rôle déterminant, en partenariat avec la progestérone avec laquelle elle est mécanistiquement liée.

L’objectif de cette étude est de déterminer si les concentrations folliculaires en PGE2 et/ou en progestérone sont liées à la qualité ovocytaire chez des patientes au cours de tentatives de FIV avec micro-injection de spermatozoïdes (ICSI).

La première partie de ce travail sera consacrée à des rappels sur la physiologie de la reproduction et ses processus de régulation, permettant la production d’un ovocyte mature. Puis nous décrirons plus précisément la voie de production de la PGE2 dans le follicule ovarien et son lien avec la production de progestérone, afin de comprendre leurs rôles au sein du follicule pré-ovulatoire. Dans un second temps, nous présenterons les patientes sélectionnées pour l’étude et évaluerons l’influence de la PGE2 et de la progestérone folliculaires sur la qualité ovocytaire au cours de tentatives d’ICSI.

GENERALITES

1. FERTILITE ET QUALITE OVOCYTAIRE

Actuellement, environ 13 à 15% des couples consultent pour des difficultés à concevoir, d'où un recours de plus en plus fréquent aux techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) (Kamel, 2010). En France, on estime qu'un couple sur 7 consultera pour problème d'infertilité au cours de sa vie reproductive. L'infertilité est caractérisée par la difficulté ou l'incapacité d'un couple à concevoir un enfant. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit l'infertilité comme l'incapacité d'un couple à procréer ou à mener une grossesse à terme au bout d'une année ou plus de rapports sexuels réguliers non protégés.

L'infertilité peut résulter de différents facteurs. Dans 30 % des cas, la cause est d'origine féminine, dans 20 % d'origine masculine, dans 40 % d'origine mixte, et dans 10 % des cas, aucune étiologie n'est retrouvée et l'infertilité demeure inexpliquée. Les principales causes féminines sont majoritairement représentées par les troubles de l'ovulation (anovulation ou dysovulation, 32 %), les obstructions tubaires (26 %), l'endométriose (4%), les anomalies cervicales (4 %) ou les anomalies utérines (4 %) (Thonneau et al., 1991). Chez l'homme, l'infertilité est fréquemment liée à une altération des paramètres spermatiques telle que l'oligo-asthéno-tératospermie (50 %), plus rarement à une absence totale de spermatozoïde ou azoospermie (10 %) (Thonneau et al., 1991).

De nombreux facteurs peuvent altérer la fertilité, au premier rang desquels l'âge maternel. La fertilité féminine diminue en effet rapidement après 35 ans, ainsi que les taux de succès de tous les traitements de l'infertilité. Cette altération de la fertilité est directement liée à une diminution de la quantité de follicules disponibles comme en témoigne la baisse de la réserve ovarienne, mais aussi à leur qualité décroissante. Un ovocyte de bonne qualité est capable de subir les processus d'ovulation, de fécondation, de développement embryonnaire et enfin d'implantation pour aboutir à une grossesse viable.

L'évaluation de la qualité ovocytaire au cours d'une tentative de FIV est d'un intérêt croissant pour les embryologistes et les biologistes de la Reproduction. Lors de tout processus de FIV, avec ou sans micro-injection de spermatozoïde, la meilleure qualité ovocytaire est recherchée. Elle est primordiale pour augmenter les chances de développement embryonnaire puis de grossesse. L'identification et la sélection des ovocytes les plus compétents permettraient d'obtenir des embryons viables présentant un fort potentiel d'implantation, d'augmenter ainsi les taux de succès en FIV et de réduire le nombre d'embryons à transférer.

Plusieurs méthodes de sélection ovocytaire ont été proposées. L'étude morphologique de l'ovocyte est relativement répandue, simple et rapide. Il s'agit d'examiner au microscope l'aspect de l'ovocyte après la ponction folliculaire : la présence d'un premier globule polaire signant le stade de métaphase II ou encore l'homogénéité du cytoplasme sont théoriquement des indicateurs de bonne qualité ovocytaire. Cependant les critères morphologiques seuls ne suffisent pas à prédire de manière satisfaisante la qualité ovocytaire ou le développement embryonnaire (Balaban and Urman, 2006).

Le liquide folliculaire dans lequel flotte le complexe cumulo-ovocytaire (COC) juste avant la rupture folliculaire, procure un micro-environnement très important pour le développement des ovocytes. Il provient du transfert de constituants du plasma après passage de la barrière folliculaire, et de l'activité sécrétoire des cellules ovocytaires, des cellules de la granulosa et des cellules thécales. Il est le reflet de la relation paracrine existant entre l'ovocyte et les cellules somatiques qui l'entourent, et contient de nombreux facteurs dont l'étude présente un intérêt croissant afin de prédire les qualités ovocytaires.

L'obtention d'ovocytes de bonne qualité requiert l'implication de nombreuses voies de signalisation mettant en jeu plusieurs facteurs, et ce dès les premiers stades de développement folliculaire.

2. DE L'OVOGONIE A L'OVOCYTE II : L'OVOGENESE

L'ovogenèse constitue l'ensemble des processus de formation, croissance et différenciation qui transforment une cellule souche de la lignée germinale, l'ovogonie, en une cellule apte à être fécondée, l'ovocyte II. Il s'agit d'un phénomène discontinu qui se déroule sur plusieurs années.

Pendant la période fœtale, les ovogonies se multiplient rapidement par mitose, colonisant les gonades en formation. Puis elles entament leur méiose et restent bloquées en prophase de première division, formant un stock définitif d'environ 6 à 7 millions de follicules primordiaux. Ceux-ci sont constitués d'un ovocyte I entouré d'une monocouche de cellules somatiques constituant les cellules de la granulosa. Du 7ème mois de la vie fœtale à la puberté, la croissance est interrompue et la grande majorité des follicules primordiaux dégénèrent. A la puberté environ 400 000 follicules primordiaux demeurent, constituant la « réserve ovarienne ».

A partir de la puberté, la croissance folliculaire et conjointement la croissance ovocytaire reprennent. Les follicules primordiaux sortent quotidiennement du stock constitué pour poursuivre leur maturation, appelée folliculogénèse.

La croissance folliculaire se déroule en deux phases successives :

- La croissance folliculaire basale est une étape de croissance lente et continue, essentiellement contrôlée par des facteurs locaux.
- La croissance folliculaire terminale, qui se termine à l'ovulation, est étroitement contrôlée par les gonadotrophines hypophysaires (FSH et LH).

Les Figures 1 et 2 illustrent respectivement la croissance folliculaire et les aspects morphologiques des follicules au cours de leur développement.

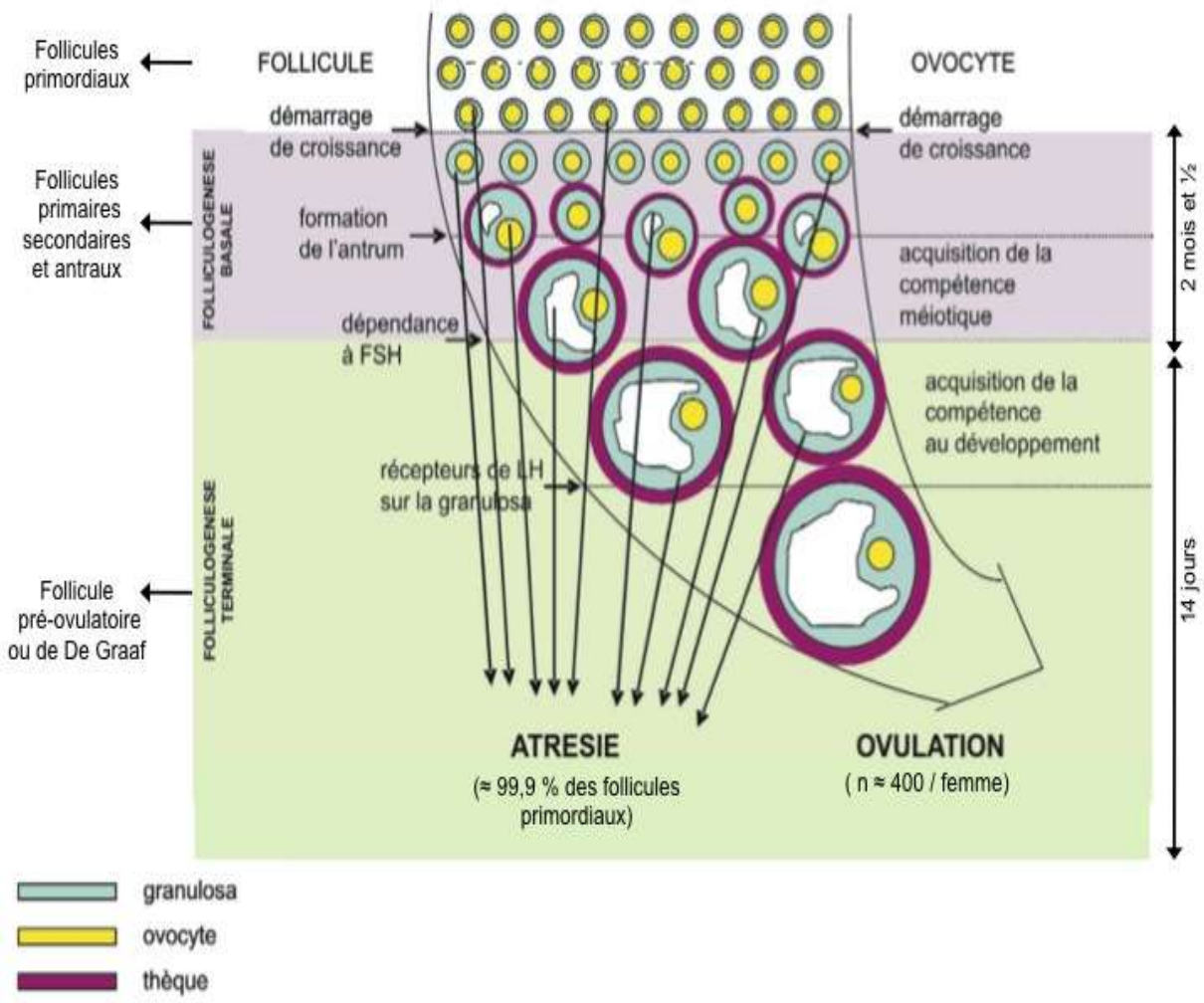


Figure 1 : Principales étapes du développement folliculaire (d'après McGee and Hsueh, 2000; Monniaux et al., 2009).

2.1. La croissance folliculaire basale

L'évolution du follicule primordial vers le follicule primaire et secondaire, ou « préantral », s'accompagne de l'augmentation de taille de l'ovocyte et de la prolifération des cellules de la granulosa, qui s'organisent en couches concentriques autour de l'ovocyte.

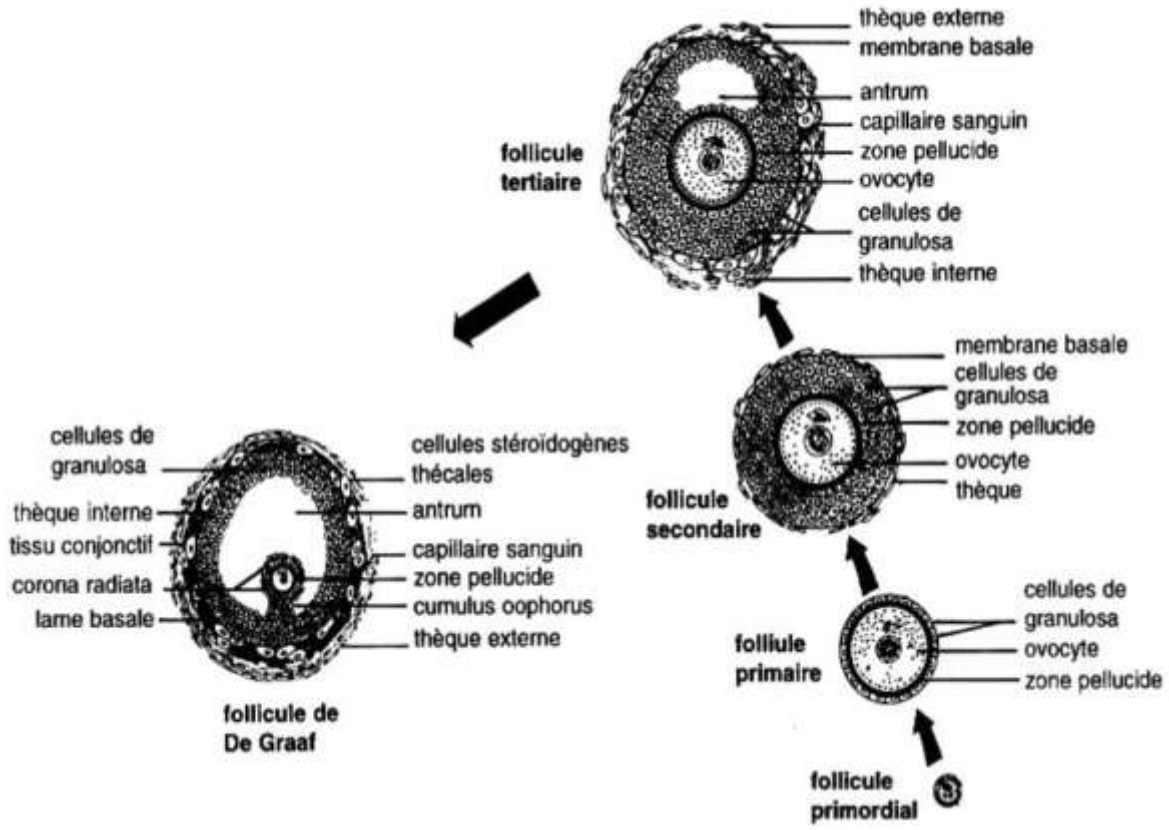


Figure 2 : Caractéristiques morphologiques des follicules au cours de la folliculogénèse.

Le passage au follicule tertiaire, ou « antral », est caractérisé par la poursuite de la multiplication des cellules de la granulosa, la différenciation de la thèque interne, le développement de la vascularisation dans les thèques et la formation de l'antrum, cavité remplie de liquide folliculaire.

Le liquide folliculaire est composé de produits sécrétés par les cellules de la granulosa, par l'ovocyte, et également par des éléments de la circulation périphérique apportés par la vascularisation folliculaire. Les mécanismes de sa formation et sa composition seront ensuite détaillés.

Cette phase est totalement indépendante de l'axe gonadotrope, mais sous la dépendance de facteurs locaux, tels que des facteurs de croissance appartenant à la famille du TGF-β : le GDF-9, le BMP-15 et l'AMH, dans un contexte de relations paracrines entre l'ovocyte et les cellules qui l'entourent. Cependant la majorité des follicules disparaissent par atrésie avant d'atteindre ce

stade. Une vingtaine de jours avant l'ovulation, seule une dizaine de follicules, de 2 à 5 mm de diamètre, sont recrutés pour la phase finale de maturation.

2.2. La croissance folliculaire terminale

Cette phase ne débute qu'à la puberté et se poursuit jusqu'à l'épuisement du stock folliculaire, à la ménopause. Elle dure en moyenne 14 jours et correspond au recrutement pendant la phase folliculaire du cycle, sous l'action des hormones hypophysaires, du follicule tertiaire le plus mature. Il poursuivra seul sa maturation pour devenir le follicule pré-ovulatoire ou follicule de De Graaf. Les caractéristiques de cette étape sont l'accroissement du volume de l'antrum, la diminution de la prolifération des cellules de la granulosa et la différenciation des cellules de la granulosa et de la thèque en cellules stéroïdiennes. La différenciation des cellules de la granulosa est caractérisée par une forte expression des enzymes de la stéroïdogénèse et l'acquisition des récepteurs à la LH. Les cellules de la granulosa comportent deux sous-populations : les cellules qui entourent directement l'ovocyte sont les cellules du cumulus oophorus, et les cellules qui bordent la cavité antrale sont les cellules murales de la granulosa.

Parallèlement à cette croissance folliculaire, l'ovocyte débute une maturation cytoplasmique, augmente de volume et s'entoure d'une enveloppe glycoprotéique appelée zone pellucide. Sous l'effet de la décharge pré-ovulatoire de LH, l'ovocyte reprend le cours de sa maturation nucléaire. La première division de méiose se termine, expulsant le premier globule polaire, et se bloque en métaphase de deuxième division (métaphase II). La synthèse d'acide hyaluronique par les cellules de la granulosa et du cumulus oophorus permet la dissociation des cellules du cumulus oophorus. Ce phénomène appelé expansion du complexe cumulo-ovocytaire, est indispensable au processus ovulatoire car il permet la libération de ce complexe cumulo-ovocytaire (COC) dans le liquide folliculaire de la cavité antrale.

La Figure 3 représente les caractéristiques morphologiques d'un follicule pré-ovulatoire.

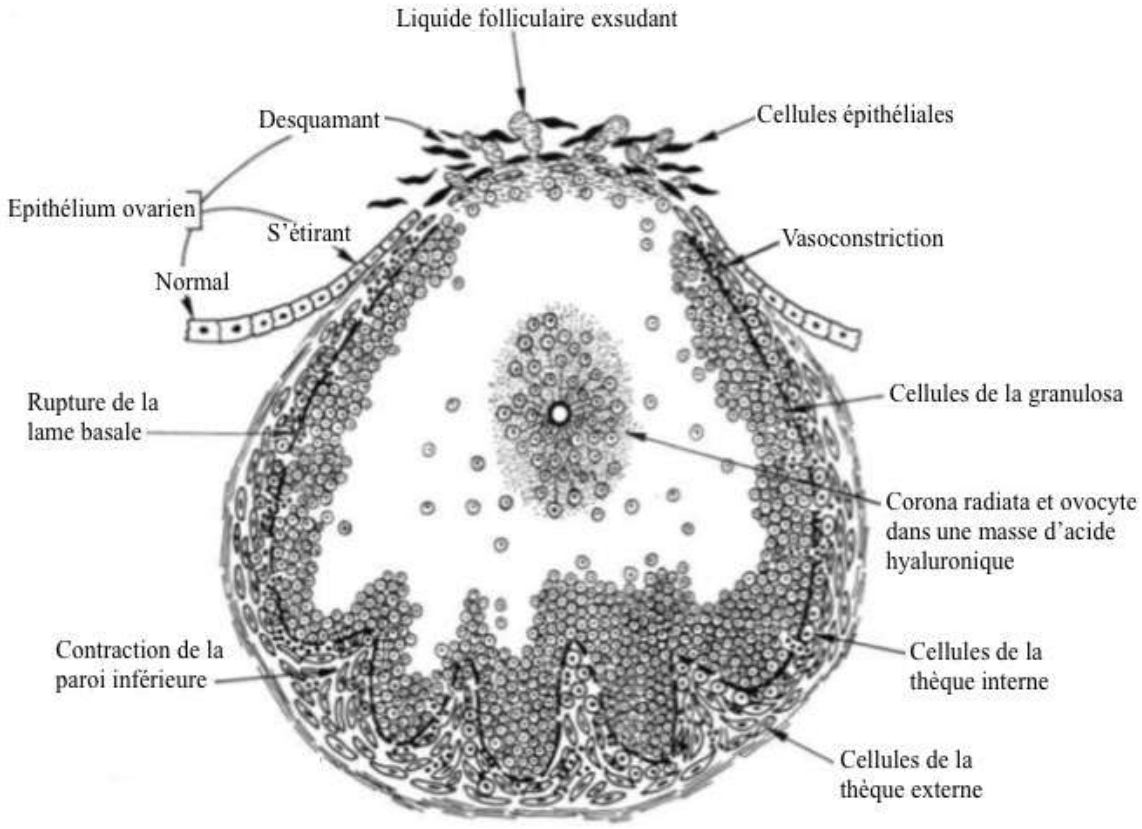


Figure 3 : Aspect morphologique d'un follicule pré-ovulatoire (d'après Driancourt et al., 2001).

Enfin le pic de LH active, environ 37 heures après la décharge pré-ovulatoire de LH, des systèmes enzymatiques présents dans les couches folliculaires aboutissant à la rupture folliculaire et à la libération du COC dans la trompe utérine. Après l'expulsion de l'ovocyte, le follicule prend un aspect déhiscent, les cellules de la granulosa et de la thèque se lutéinisent, formant le corps jaune. En l'absence de fécondation, celui-ci involue par lutéolyse à la fin de la phase lutéale. Seuls 0,1% soit au maximum 400 follicules primordiaux ovuleront dans la vie d'une femme, les autres seront voués à l'atrésie.

Au cours d'une procédure de FIV, la ponction folliculaire intervient juste avant l'ovulation, c'est-à-dire 36 heures après la décharge de LH. Le COC ainsi que le liquide folliculaire dans lequel il flotte sont aspirés et récupérés.

3. FORMATION ET COMPOSITION DU LIQUIDE FOLLICULAIRE

Selon Rodgers *et al*., le liquide folliculaire est dérivé du plasma par le passage de plusieurs constituants au travers des capillaires thécaux. Les capillaires thécaux ne se développent qu'à partir du stade préantral, et le liquide folliculaire ne commence à se former qu'à partir de ce stade. La constitution du liquide folliculaire est rendue possible grâce à plusieurs mécanismes (Rodgers and Irving-Rodgers, 2010).

Le premier mécanisme est la production par l'ovocyte et les cellules de la granulosa de molécules oncotiquement actives, incapables de traverser ni la granulosa ni la membrane basale folliculaire. Le gradient osmotique ainsi formé est responsable du second mécanisme : le passage inter ou transcellulaire des composants plasmatiques au travers de la « barrière folliculaire ». L'endothélium des capillaires thécaux, la membrane basale sous-endothéliale, l'interstitium, la membrane basale folliculaire et enfin la couche des cellules de la granulosa sont traversés (Figure 4). Les flèches 1 et 3 figurent le mouvement du fluide entre les différents compartiments : le capillaire, l'interstitium, et le liquide folliculaire. Les flèches 2 et 4 montrent le passage transcellulaire du fluide.

Il a été montré que les molécules oncotiquement actives du liquide folliculaire, sont essentiellement représentées par les glycosaminoglycannes tels que l'acide hyaluronique, le chondroïtine sulfate (dont le versican) et le dermatane sulfate (Clarke et al., 2006). Ces molécules très hydrophiles et chargées négativement exercent une forte pression oncotique. L'acide hyaluronique a été retrouvé en forte concentration dans le liquide folliculaire humain, 50 ng/mL, et est localisé autour des cellules de la granulosa (Saito et al., 2000). Ces dernières expriment l'enzyme Hyaluronan Synthase 2 (Has 2) et produisent l'acide hyaluronique (Schoenfelder and Einspanier, 2003). Il semble que l'acide hyaluronique soit une des principales molécules à l'origine du potentiel oncotique du liquide folliculaire. L'acide hyaluronique est de plus associé à la formation de la matrice entourant le complexe cumulo-ovocytaire et est directement impliqué dans son processus d'expansion.

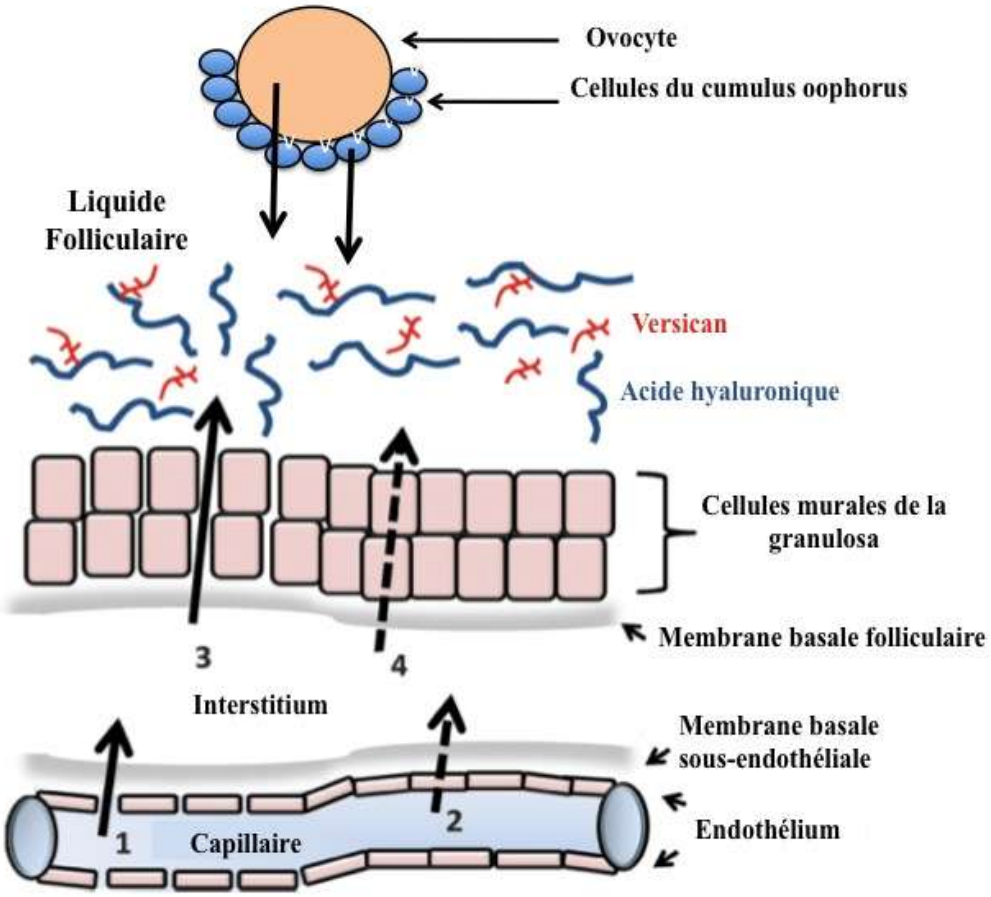
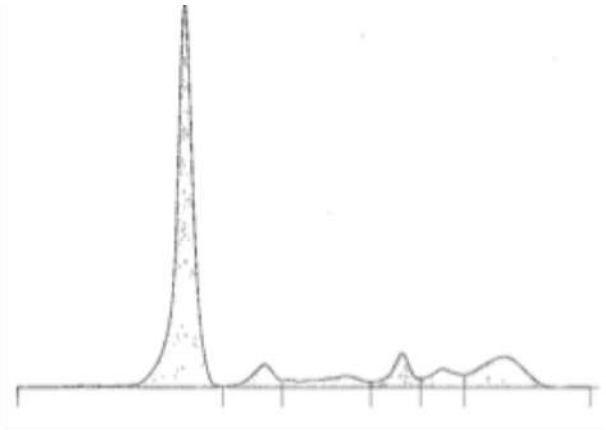


Figure 4 : Mécanismes de formation du liquide folliculaire (d'après Rodgers and Irving-Rodgers, 2010).

Ainsi le liquide folliculaire présente une composition très proche de celle du plasma sanguin, notamment pour les protéines de faible poids moléculaire. Les protéines de poids moléculaires supérieur à 100 kDa sont habituellement retrouvées en plus faible concentration dans le liquide folliculaire.

La Figure 5 représente le profil électrophorétique des protéines folliculaires, comparable à un profil sérique normal.



Fraction	%	Normales sériques %
Albumine	64,3	55,8 -,66,1
Alpha 1	5,0	2,9 - 4,9
Alpha 2	5,8	7,1 - 11,8
Bêta 1	6,6	4,7 - 7,2
Bêta 2	5,2	3,2 - 6,5
Gamma	13,1	11,1 – 18,8v

Figure 5 : Profil électrophorétique des protéines folliculaires (Electrophorèse capillaire SEBIA réalisée sur automate Capillarys II).

4. LES FACTEURS DE REGULATION DE LA FOLLICULOGENESE

La folliculogénèse est régulée de manière endocrine par les gonadotrophines hypophysaires sous le contrôle de la GnRH hypothalamique. Le rôle de la FSH et de la LH est essentiel mais des facteurs locaux sont de plus en plus impliqués dans la régulation de la folliculogénèse. L'ovocyte, les cellules de la granulosa et de la thèque produisent, dans le cadre de relations paracrines, un certain nombre de facteurs qui modulent l'action des gonadotrophines.

4.1. Régulation par les gonadotrophines

La régulation endocrine intervient à trois niveaux : hypothalamique avec la sécrétion pulsatile du GnRH, hypophysaire avec la sécrétion cyclique de FSH et de LH et enfin ovarien avec la stéroïdogénèse. Elle est elle-même régulée par un système de rétrocontrôle positif et négatif par les stéroïdes et l'inhibine (Gougeon, 1996).

Les premières étapes de la folliculogénèse sont peu dépendantes des gonadotrophines. En effet, les patientes hypophysectomisées ou sous pilule oestroprogestative, ont une folliculogénèse qui n'atteint que le stade préantral. La croissance folliculaire terminale est quant à elle une étape

dépendante des gonadotrophines. La FSH permet, par son action mitogène, la poursuite de la croissance folliculaire mais également la maturation folliculaire en induisant la différenciation des cellules de la granulosa, l'acquisition de l'activité aromatase et l'expression des récepteurs à la LH. La LH intervient quant à elle pour initier la stéroïdogénèse thécale, la dominance d'un follicule unique et l'ovulation.

Les récepteurs pour la FSH sont exprimés par les cellules de la granulosa dès le stade de follicule primaire, leur nombre varie peu mais la sensibilité des follicules à la FSH s'accroît. La FSH est la seule gonadotrophine impliquée dans le recrutement folliculaire. Les récepteurs de la LH sont exprimés dans un premier temps par les cellules de la thèque interne à partir du stade pré-antral et leur nombre s'accroit avec la taille du follicule. Ils apparaîtront sur les cellules de la granulosa du follicule pré-ovulatoire. Sous l'effet des gonadotrophines, le follicule produit des hormones stéroïdes : androgènes et œstrogènes.

4.2. Régulation intra-folliculaire de la stéroïdogénèse

Cette fonction endocrine est régulée dans l'ovaire par des médiateurs solubles synthétisés par les cellules de la granulosa (AMH, IGF-1 et IGF-2, inhibine, activine, EGF, TGF-β, 17-β-estradiol) et par les cellules de la thèque interne (IGF-1 et IGF-2, EGF, TGF-β, androgènes). La Figure 6 représente les principaux facteurs impliqués dans les relations paracrines entre les 3 types cellulaires du follicule : l'ovocyte, les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque.

La stéroïdogénèse folliculaire aboutit à la synthèse des estrogènes. Sous le contrôle de la FSH, les cellules de la granulosa aromatisent en oestrogènes les androgènes produits par les cellules de la thèque interne, sous l'effet de la LH (Drummond, 2006). Plusieurs systèmes autocrines ou paracrines sont impliqués dans la régulation de la stéroïdogénèse :

- Le système des IGFs/Insuline amplifie les effets de la FSH sur les cellules de la granulosa et ceux de la LH sur les cellules de la thèque, aboutissant à un effet positif sur la croissance folliculaire et la synthèse des stéroïdes (Webb et al., 1999).

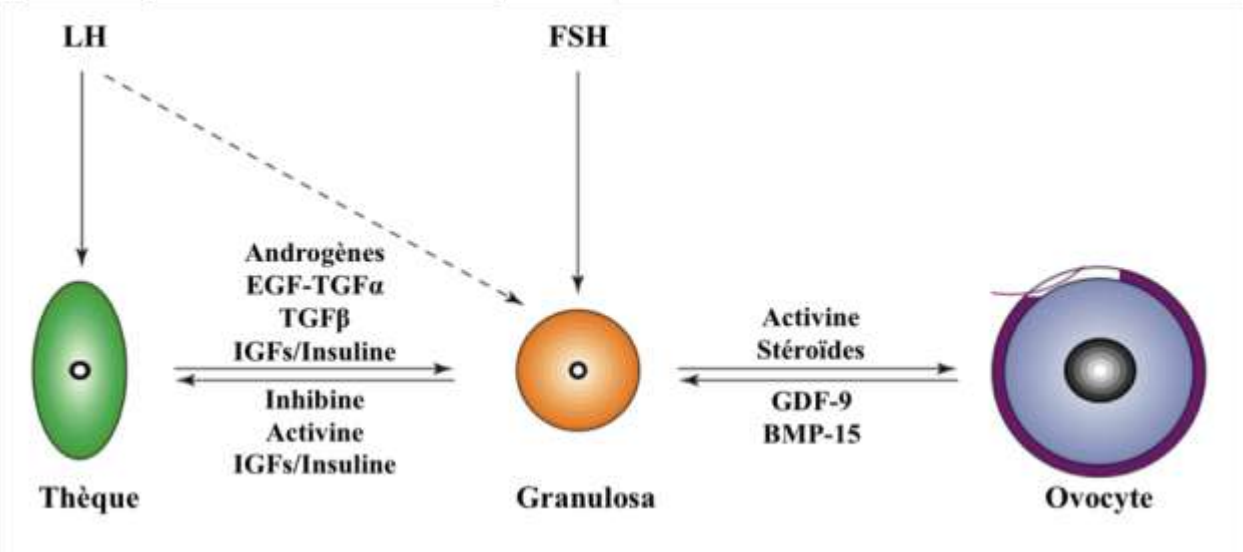


Figure 6 : Principaux systèmes et facteurs impliqués dans la communication entre les 3 principaux types cellulaires du follicule ovarien (d'après Knight and Glister, 2001).

- L'AMH (hormone anti-müllérienne), appartenant à la famille du TGF-β, est sécrétée par les cellules de la granulosa des petits follicules antraux. Cette hormone inhibe le recrutement des follicules primordiaux et contrôle le pool des follicules recrutables. Elle représente à l'heure actuelle l'un des meilleurs marqueurs biologiques de la réserve ovarienne.

- Le système inhibine/activine permet de réguler les taux de FSH et l'activité aromatase des cellules de la granulosa (Knight and Glister, 2001).

- Les facteurs EGF/TGF-α sont synthétisés par les cellules de la granulosa et de la thèque interne. L'EGF a un effet mitogène sur les cellules de la granulosa et inhibe l'activité aromatase. Le TGF-α favorise la différenciation des cellules thécales par la synthèse des récepteurs de la LH par les cellules de la thèque interne (Webb et al., 1999).

- Le TGF-β est produit par les cellules de la thèque et de la granulosa et inhibe la prolifération des cellules de la granulosa. Ce facteur inhibe la synthèse des androgènes et favorise la synthèse de progestérone (Elvin et al., 2000b).

5. RELATION PARACRINE OVOCYTE/CELLULES SOMATIQUES

5.1. Les bases de la relation paracrine

Durant la folliculogénèse, un véritable dialogue s'instaure entre l'ovocyte, les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque dans le follicule. Ce signal bidirectionnel entre l'ovocyte et les cellules somatiques qui l'entourent est absolument essentiel pour assurer le succès du développement des cellules germinales chez les mammifères. Il est indispensable au développement et à la maturation ovocytaire. Les bases de cette communication ont été mises en évidence initialement dans les cellules de la granulosa. Ces cellules procurent à l'ovocyte des nutriments essentiels à son développement et jouent un rôle nutritif (Buccione et al., 1990a). Elles participent aussi au maintien de l'arrêt de la division méiotique, à une suppression globale de l'activité transcriptionnelle ovocytaire et à l'induction de la maturation cytoplasmique et nucléaire ovocytaire (Eppig, 1991). Il a été montré par la suite, que l'ovocyte joue un rôle actif dans la régulation et le développement des fonctions des cellules de la granulosa, durant toute la folliculogénèse. L'ovocyte influence la sortie du follicule primordial du pool folliculaire et permet les transitions folliculaires du stade primaire à secondaire et préantral à antral (Dong et al., 1996; Galloway et al., 2000; Orisaka et al., 2006). L'ovocyte entraîne la prolifération et la différenciation des cellules de la granulosa avant la décharge de LH (Gilchrist et al., 2004; Otsuka et al., 2005; Vitt et al., 2000), l'expansion du COC et l'ovulation après la décharge (Buccione et al., 1990b; Dragovic et al., 2007; Joyce et al., 2001).

Il apparaît finalement que c'est l'ovocyte qui orchestre ce dialogue (Eppig et al., 2002; Matzuk et al., 2002).

5.2. Les bases physiques du dialogue ovocyte/cellules somatiques

Cette relation étroite s'établit entre l'ovocyte et les cellules somatiques notamment par la mise en place de jonctions communicantes, établissant un syncytium fonctionnel (Anderson and

Albertini, 1976). Ces jonctions communicantes facilitent le transfert des molécules de petit poids moléculaire entre les cellules de la granulosa (murales ou du cumulus oophorus) et l'ovocyte, mais aussi entre les cellules de la granulosa elles-mêmes (Albertini et al., 2001; Gilchrist et al., 2008). Cependant l'ovocyte et les cellules du cumulus sont physiquement séparés par la zone pellucide entourant l'ovocyte. Pour permettre la communication entre l'ovocyte et les cellules du cumulus, ces dernières ont développé des projections cytoplasmiques trans-zonales, qui pénètrent au travers de la zone pellucide et atteignent la membrane plasmique ovocytaire. Les jonctions communicantes se trouvent à l'extrêmité de ces projections cytoplasmiques. Ces jonctions communicantes sont formées de sous unités : les connexines (Cecconi et al., 2004). L'isoforme majeure formant les jonctions communicantes entre l'ovocyte et les cellules du cumulus ou les cellules préantrales de la granulosa est la connexine 37. La connexine 43 est l'isoforme composant les jonctions communicantes entre les cellules de la granulosa. Ces jonctions communicantes permettent le passage de molécules de faible poids moléculaire telles que les acides aminés, les métabolites (pyruvate), et les molécules de signal intracellulaire (AMPc, GMPc, inositol tri-phosphate…) (Su et al., 2009). L'expression de la connexine 37 par les ovocytes est essentielle pour la communication avec les cellules de la granulosa et joue un rôle primordial dans la croissance folliculaire. En effet chez les souris invalidées pour le gène *Cx37-/-,* la folliculogénèse est bloquée au stade pré-antral, et les souris sont stériles (Simon et al., 1997). La connexine 43 semble également importante puisque le développement folliculaire chez les souris invalidées pour cette connexine est interrompu très précocement avant le stade antral (Ackert et al., 2001).

La communication entre l'ovocyte et les cellules somatiques est bi-directionnelle, mettant en jeu des jonctions communicantes et une signalisation paracrine. Les cellules du cumulus jouent un rôle indispensable dans l'acquisition de la compétence du développement par l'ovocyte, et dans le processus de l'ovulation (Russell and Robker, 2007). L'ovocyte, lui, contrôle les principales fonctions folliculaires par la sécrétion de nombreux facteurs, et maintient ainsi son micro-environnement, indispensable à son propre développement. Dans le cadre de tentatives de maturation *in vitro* (MIV), plusieurs études ont montré que la qualité ovocytaire était influencée par les facteurs sécrétés par l'ovocyte lui-même. La capacité des ovocytes bovins et murins, après MIV, à accéder au stade de blastocyste, est améliorée par l'ajout de facteurs exogènes d'origine

ovocytaire (Hussein et al., 2006; Yeo et al., 2008). Ceci suggère que l'ovocyte sécrète des facteurs qui jouent un rôle dans la régulation de la qualité ovocytaire (Gilchrist et al., 2008). Plusieurs facteurs sont impliqués dans la communication entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa. D'une part, il a été démontré que l'ovocyte synthétise et secrète plusieurs facteurs de la famille du TGF-β, essentiellement représentés par le GDF-9 ou le BMP15, agissant sur les cellules du cumulus oophorus et les cellules murales de la granulosa. D'autre part, ces cellules synthétisent de nombreux facteurs, dont la progestérone et les prostaglandines, qui influencent la maturation ovocytaire, notamment son aptitude à être ovulé, fécondé et à aboutir à une grossesse viable.

6. LES FACTEURS OVOCYTAIRES : BMP 15 ET GDF-9

La famille du TGF-β est composée de peptides sécrétés qui jouent un rôle critique dans la régulation de multiples événements tels que la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, l'apoptose durant l'embryogénèse et la vie adulte (Massague, 1998). Les membres de cette famille sont synthétisés sous forme de prépropeptides qui subissent des clivages protéolytiques. Les formes matures sont des homodimères ou hétérodimères liés par des ponts disulfures.

Plusieurs membres de cette famille sont exprimés par l'ovaire, tels que l'hormone anti-müllérienne (AMH), l'inhibine α, l'activine αA et βB, le GDF-9, le BMP-6 (bone morphogenic protein 6) et le BMP-15. Certains de ces facteurs jouent un rôle important dans la régulation des fonctions de reproduction (Dube et al., 1998; Elvin and Matzuk, 1998; McGrath et al., 1995; Nishimori and Matzuk, 1996).

Dans l'ovaire, le GDF-9, le BMP-6 et le BMP-15 sont exprimés spécifiquement par l'ovocyte (Dong et al., 1996; Dube et al., 1998; McGrath et al., 1995). En particulier, le GDF-9 et le BMP-15 sont exprimés spécifiquement dans les ovocytes à partir du stade 3a des follicules préantraux (petits follicules primaires composés d'une seule couche de cellules de la granulosa), et leur expression persiste dans les ovocytes durant toute la folliculogénèse, y compris au sein des

complexes cumulo-ovocytaires après l'ovulation (Dube et al., 1998; Elvin et al., 1999a; McGrath et al., 1995).

6.1. Voies de signalisation du GDF-9 et du BMP-15

Les membres de cette famille se lient à des récepteurs à un seul domaine transmembranaire ayant une activité serine/thréonine kinase. Le GDF-9 se lie au récepteur BMP de type II, entraînant la phosphorylation de l'ALK 5 (activin receptor-like kinase) qui active une voie de signalisation intracellulaire par phosphorylation des protéines intracellulaires Smad-2 et Smad-3 (Vitt et al., 2002). Ces protéines phosphorylées, associées à Smad-4, forment un complexe qui se transloque au noyau afin d'y réguler l'expression de gènes-cibles. Le complexe Smad se lie au promoteur de ces gènes au niveau du Smad binding Element (SBE), et active ou réprime leur expression transcriptionnelle (Gilchrist et al., 2008; Mazerbourg and Hsueh, 2003).

BMP-15 quant à lui, active une voie légèrement différente. Il se lie au même récepteur BMP de type II mais permet la phosphorylation de l'ALK 6 et des protéines intracellulaires Smad 1, 5 et 8 (Gilchrist et al., 2008; Mazerbourg and Hsueh, 2003). La Figure 7 représente les voies de signalisation activées par le GDF-9 et le BMP-15 et leurs rôles respectifs dans les cellules du cumulus ou de la granulosa.

6.2. Relations GDF-9/BMP-15

Plusieurs travaux tendent à prouver que le GDF-9 est le principal facteur paracrine sécrété par l'ovocyte capable de réguler les processus d'expansion du COC et de maintenir un micro-environnement ovocytaire optimal (Elvin et al., 2000b).

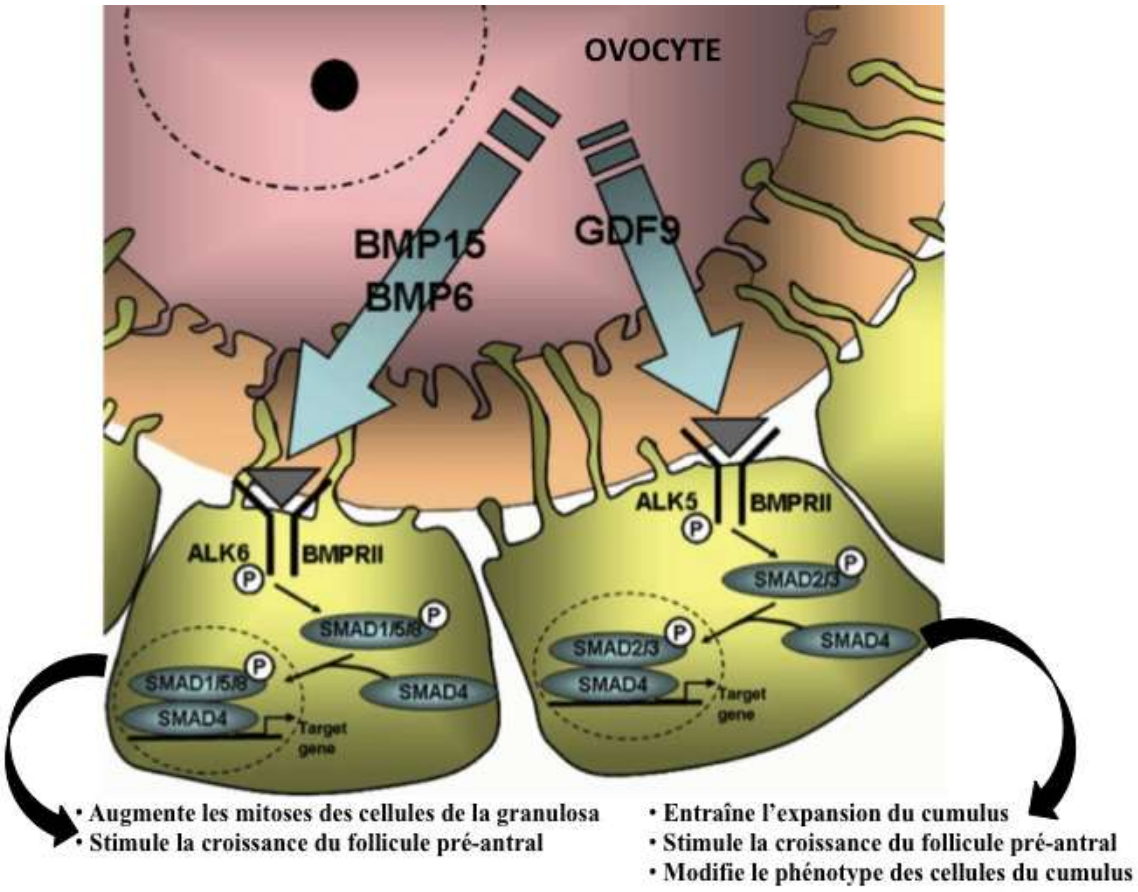


Figure 7 : Voies de signalisation du GDF-9 et du BMP-15 et leurs rôles respectifs en période pré-ovulatoire (d'après Gilchrist et al., 2008)

En effet, le GDF-9 induit la production de progestérone et de prostaglandines en période pré-ovulatoire, et stimule l'expansion du COC. Ces processus sont absolument nécessaires pour une ovulation et une fécondation efficaces (Lim et al., 1997). A contrario, BMP-15 n'est pas nécessaire. BMP-15 est incapable de moduler l'expression des gènes conduisant à l'expansion du COC ou d'augmenter la synthèse de progestérone en période péri-ovulatoire (Elvin et al., 2000b). Le BMP-15 aurait ainsi une action synergique avec le GDF-9 et permettrait surtout de potentialiser l'action de ce dernier (Feuerstein et al., 2006; Su et al., 2004).

6.3. Rôles du GDF-9 au cours de la croissance folliculaire précoce

Il a été démontré grâce à des modèles animaux que pendant la croissance folliculaire précoce, le GDF-9 et le BMP-15 jouent un rôle primordial (Otsuka et al., 2011) et semblent avoir une action synergique (Yan et al., 2001). Les conséquences de l'absence ou l'invalidation d'un des deux gènes varient selon les espèces. L'invalidation du gène *GDF-9* chez la souris entraîne une stérilité des souris (Dong et al., 1996), alors que les souris invalidées pour *BMP-15* sont hypofertiles par diminution du taux d'ovulation et de fécondation (Yan et al., 2001). La croissance folliculaire basale des souris invalidées pour GDF-9 est bloquée au stade de follicule primaire, les ovocytes ont une assise de cellules de la granulosa et un ovocyte de taille augmentée qui s'avère incompétent pour poursuivre le processus méiotique (Carabatsos et al., 1998; Elvin et al., 1999b). Des brebis immunisées contre GDF-9 présentent également un blocage du développement au stade de follicule primaire (Juengel et al., 2002). Les brebis déficientes en BMP-15 sont stériles, leur croissance folliculaire s'arrêtant au stade de follicule primaire (Galloway et al., 2000). Ainsi dans cette espèce, le GDF-9 et le BMP-15 sont requis pour mener une folliculogénèse normale (Galloway et al., 2000).

Chez la femme, l'identification de mutations dans la séquence de *GDF-9* chez des femmes atteintes d'Insuffisance Ovarienne Prématurée (IOP) suggère qu'une altération de la fonction de GDF-9 est impliquée dans les dysfonctions ovariennes (Chand et al., 2006; Kovanci et al., 2007; Laissue et al., 2006; Zhao et al., 2007). Des mutations non-sens et faux-sens du gène *GDF-9* ont aussi été détectées chez des mères de jumeux dizygotes, suggérant que certains variants peuvent être liés au phénotype poly-ovulatoire (Montgomery et al., 2004; Palmer et al., 2006). De la même manière, des mutations faux-sens du gène BMP-15 ont aussi été retrouvées et seraient associées à une insuffisance ovarienne prématurée (Di Pasquale et al., 2006; Dixit et al., 2006).

Il semble ainsi démontré qu'au stade préantral le GDF-9 stimule la croissance des follicules de rates ainsi que celle des follicules préantraux humains (Hayashi et al., 1999; Hreinsson et al., 2002). Au cours de la transition au stade antral, le GDF-9 permet la survie folliculaire en inhibant l'apoptose des cellules granulocytaires et l'atrésie folliculaire (Orisaka et al., 2006).

De plus, avant la décharge pré-ovulatoire de LH, les cellules du cumulus requièrent du GDF-9 mais aussi du BMP-15 pour activer les cascades métaboliques telles que la glycolyse ou la biosynthèse de cholestérol (Su et al., 2009; Sugiura and Eppig, 2005). En effet les ovocytes, déficients pour la biosynthèse de cholestérol, dépendent directement des cellules du cumulus pour leur procurer du cholestérol. Ce sont le GDF-9 et le BMP-15 sécrétés par l'ovocyte lui-même qui entraînent, via l'activation transcriptionnelle de gènes codant pour les enzymes des cascades métaboliques, cette synthèse par les cellules du cumulus, permettant à l'ovocyte de recevoir des précurseurs métaboliques adéquats et essentiels à son développement (Su et al., 2008).

6.4. Rôles du GDF-9 pendant la période péri-ovulatoire

Au cours des stades pré-ovulatoires, le GDF-9 joue aussi un rôle primordial (Otsuka et al., 2011). Le GDF-9 régule l'expression de plusieurs gènes à ce stade. Selon Elvin *et al.*, le GDF-9 est requis pour la prolifération et la différenciation des cellules de la granulosa, conduisant à la formation du follicule préantral entouré de plusieurs couches de cellules et au recrutement de cellules thécales. Dans le follicule pré-ovulatoire, le GDF-9 induit l'expression de plusieurs gènes dans les cellules de la granulosa dont Hyaluronan synthase 2 (*HAS2*) permettant la synthèse d'acide hyaluronique, et diminue l'expression de urokinase plasminogen activator *(uPA*), conduisant à l'expansion du cumulus. Le GDF-9 favorise ainsi l'expansion du cumulus en présence de FSH (Elvin et al., 1999a).

De manière intéressante, le GDF-9 permet aussi la survie et la fécondation du complexe cumulo-ovocytaire en stimulant la synthèse de progestérone par les cellules du cumulus via l'induction de l'expression de steroidogenic acute regulator protein *(StAR)* (Elvin et al., 1999a; Elvin et al., 2000b; Vitt et al., 2000). De plus, GDF-9 induit la production de prostaglandines via l'induction de cyclooxygénase 2 (COX2), enzyme-clé de la voie de synthèse des prostaglandines (Elvin et al., 1999a).

Le GDF-9 entraîne une différenciation des cellules de la granulosa. Ses rôles diffèrent dans les cellules murales de la granulosa ou dans les cellules du cumulus. Alors que la rupture folliculaire et la lutéinisation sont privilégiées au sein des cellules murales, la synthèse d'acide hyaluronique,

de progestérone et de prostaglandines par les cellules du cumulus favorisent son expansion (Figure 8).

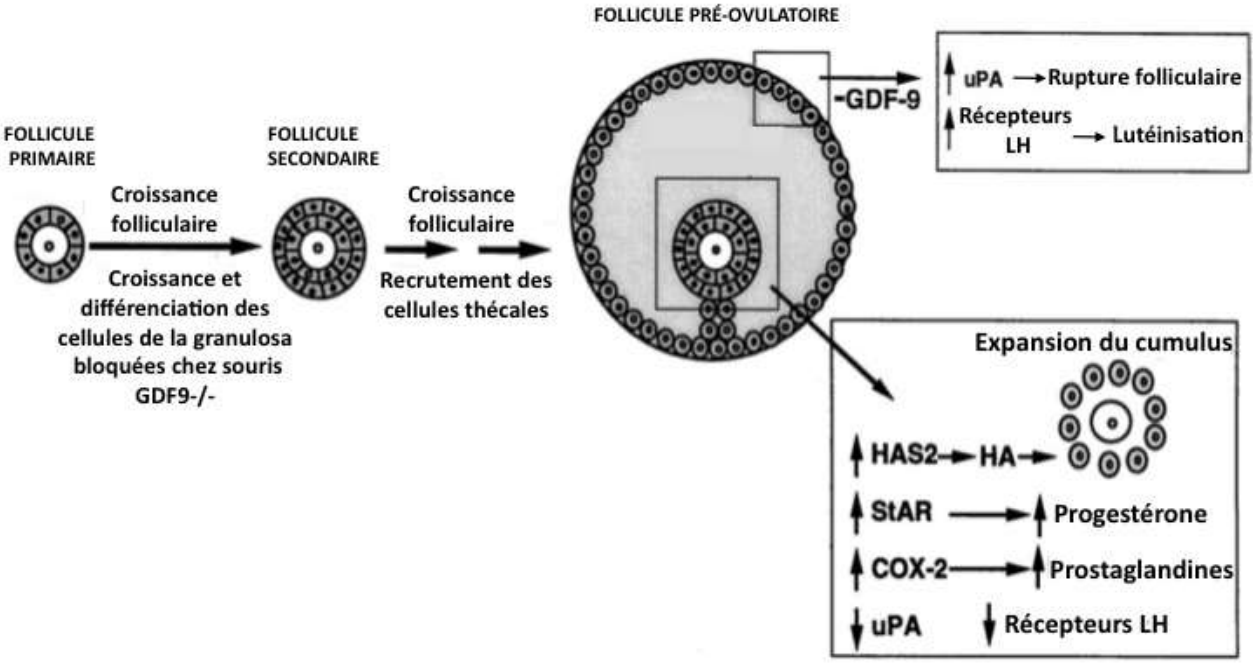


Figure 8 : Modélisation des rôles du GDF-9 dans le follicule ovarien (d'après Elvin et al., 1999a).

La synthèse de progestérone et celle de prostaglandines sont intriquées. Le GDF-9 stimule la production de progestérone par les cellules du cumulus, via une voie de signalisation EP2/PGE2 dépendante. En effet, selon Elvin *et al.*, le GDF-9 entraîne une production de PGE2 et induit l'expression d'un des récepteurs de la PGE2, EP2, dans les cellules du cumulus (Elvin et al., 2000a). PGE2, via ses récepteurs EP2, entraîne alors une production de progestérone, indispensable au processus ovulatoire. La Figure 9 résume les relations entre les différents acteurs activés par le GDF-9 en période pré-ovulatoire.

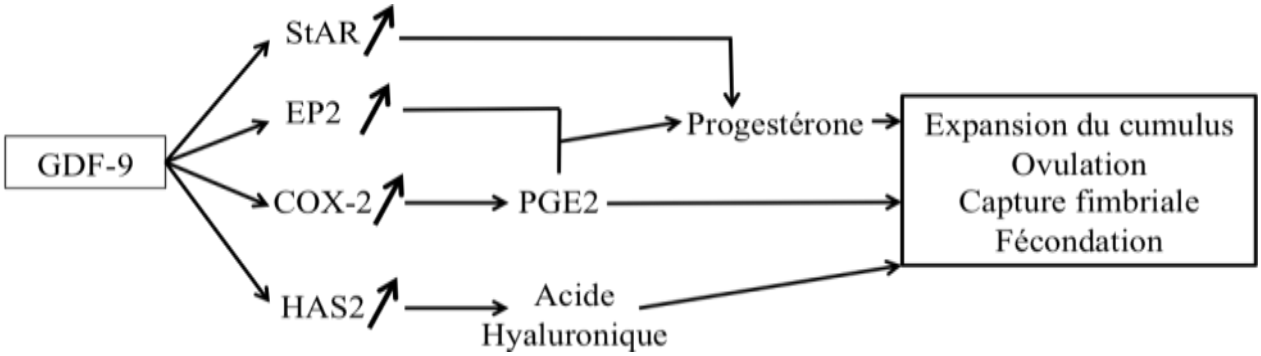


Figure 9 : Régulation des gènes-cibles du GDF-9 dans les cellules du cumulus (selon Elvin et al., 2000a).

Ainsi, au moment de la décharge de LH, le GDF-9 induit une série d'événements moléculaires dans les cellules du cumulus et l'ovocyte. Ces événements incluent : l'induction rapide de *Has2*, de *COX2*, la stimulation d'expression de *StAR*, entraînant l'augmentation de synthèse d'acide hyaluronique, de PGE2 et d'un de ses récepteurs (EP2). L'ensemble de ces éléments est nécessaire pour l'expansion du COC et l'augmentation de la synthèse de progestérone.

6.5. Relation avec la qualité ovocytaire et embryonnaire

Le GDF-9, via de nombreuses voies de signalisation, permet non seulement d'aboutir à une ovulation et une fécondation optimales de l'ovocyte, mais encore d'améliorer la qualité embryonnaire.

Les modèles *in vitro* et animaux démontrent que GDF-9 joue aussi un rôle dans la maturation *in vitro* des ovocytes murins, la qualité embryonnaire et la viabilité fétale (Yeo et al., 2008). L'addition de GDF-9 exogène à des complexes cumulo-ovocytaires bovins ou murins, cultivés en présence de FSH avant FIV, entraine une augmentation de la proportion de blastocystes obtenus et du nombre de fœtus viables. De plus, les blastocystes obtenus contenaient plus de cellules trophodermiques, signant une qualité embryonnaire potentialisée en présence de GDF-9 (Hussein

et al., 2006; Yeo et al., 2008). Ceci suggère que GDF-9 participe au développement embryonnaire et permet d'améliorer la qualité des embryons formés.

7. LA PGE2 : UN MEDIATEUR LIPIDIQUE DE LA RELATION PARACRINE OVOCYTE-CUMULUS.

La sécrétion de prostaglandines par les cellules de la granulosa avant, pendant et après l'ovulation est un phénomène bien connu. Ces médiateurs lipidiques apparaissent comme des molécules indispensables au bon déroulement des processus d'ovulation, de fécondation et d'implantation chez les mammifères. La prostaglandine sécrétée en plus grande quantité par les cellules de la granulosa est la prostaglandine E2 (PGE2) pendant la période pré-ovulatoire et elle apparaît comme la prostaglandine-clé de cette période.

La PGE2 est également la prostaglandine la plus abondante du corps humain (Serhan et al., 2003) ; elle intervient dans des systèmes fonctionnels aussi variés que la digestion, le développement, le système nerveux, la reproduction, et est impliquée dans des processus physiopathologiques tels que l'inflammation, la douleur ou la tumorigénèse. Ces fonctions différentes sont en partie dûes au fait que la PGE2 agit par l'intermédiaire de plusieurs récepteurs. Enfin et surtout, la PGE2 est impliquée chez la femme dans la régulation des processus d'ovulation et de fécondation.

7.1. Historique

Le nom « prostaglandine » vient de prostate. Dès 1936, le physiologiste suédois Ulf Von Euler isola dans le liquide séminal un composé lipidique soluble (von Euler, 1936). Dans les années 60, Bergström et Samuelsson identifièrent les prostaglandines PGE1 et PGF1α à partir d'extraits de fluides séminaux humains (Bergstrom and Samuelsson, 1962). Leurs nombreux travaux sur les prostaglandines leur permirent d'obtenir le prix Nobel de physiologie et médecine en 1982. Ils avaient déjà pu mettre en évidence la contraction des muscles lisses sous l'effet des

prostaglandines, notamment aux niveaux utérin et intestinal, et avaient envisagé l'utilisation de ces molécules dans le contrôle de la fertilité (Bergstrom et al., 1972).

7.2. Précurseurs et voies de synthèse des prostaglandines

Les prostaglandines (PG) sont des médiateurs lipidiques appartenant au groupe des eicosanoides, issus du métabolisme des acides gras polyinsaturés dont le principal précurseur est l'acide arachidonique (AA), obtenu à partir des phospholipides membranaires grâce à l'action hydrolytique des phospholipases.

En réponse à certains stimuli, la phospholipase A2 (PLA2) se mobilise vers la membrane pour libérer directement l'AA. Le devenir de l'AA est triple (Figure 10). Métabolisé par les lipoxygénases, l'AA est transformé en leucotriènes ou en dérivés mono-, di- ou tri-hydroxyacides. Métabolisé par les époxygénases dépendantes du cytochrome P450, l'AA est transformé en époxydes. Enfin, métabolisé par les cyclo-oxygénases (COX), l'AA est séquentiellement oxydé en prostaglandine G2 (PGG2) et transformé en un intermédiaire instable, la PGH2.

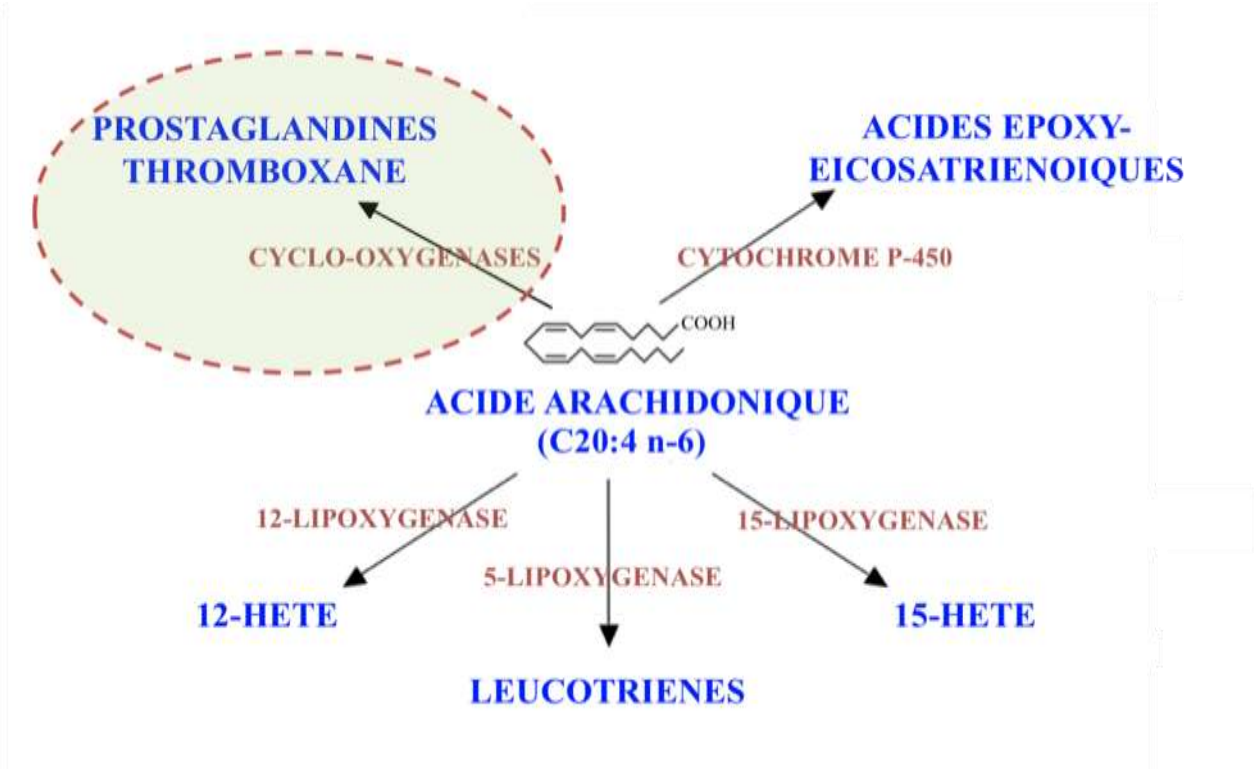


Figure 10 : Transformation métabolique de l'acide arachidonique. Les enzymes sont représentées en rouge ; les substrats et produits en bleu.

L'acide arachidonique est transformé en PGG2 puis PGH2 grâce à deux cyclo-oxygénases codées par des gènes différents : COX1 et COX2. PGH2 est rapidement converti en divers prostanoïdes et sert de substrat à plusieurs enzymes dont les PGE synthases, les PGD synthases, les PGF synthases, la prostacycline synthase et la thromboxane synthase, aboutissant à la synthèse de la PGE2, la PGD2, la PGF2α, la prostacycline I2 (PGI2) et le thromboxane A2 (TXA2) respectivement (Figure 11).

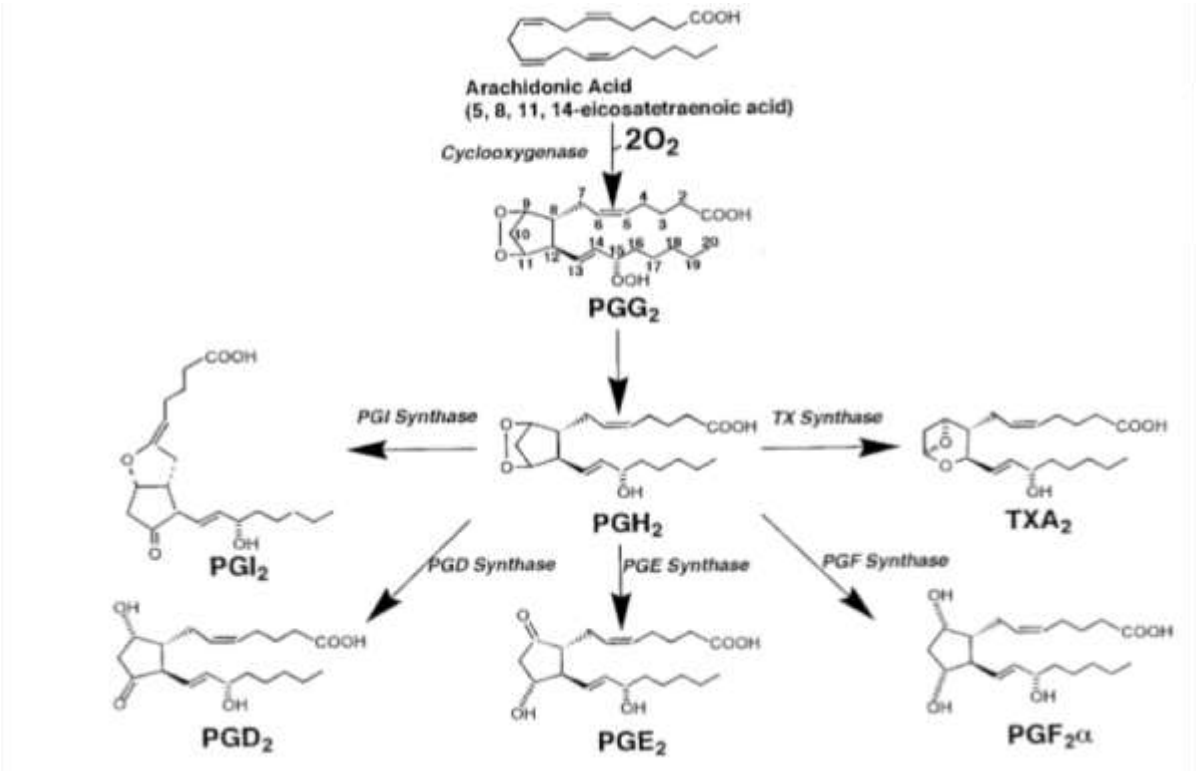


Figure 11 : Voie de biosynthèse des prostanoïdes à partir de l'acide arachidonique (d'après Narumiya et al., 1999).

7.3. Voie de synthèse de la PGE2

7.3.1. Les cyclo-oxygénases

L'enzyme COX, aussi connue sous le nom de prostaglandine H synthase, est une enzyme héminique qui catalyse deux réactions enzymatiques séquentielles : la bis-oxygénation de l'AA produisant la PGG2 (activité de cyclo-oxygénase), puis la réduction de PGG2 en PGH2 (activité d'hydropéroxydase) (Smith et al., 2000). Deux isoformes de COX existent chez les mammifères. COX1 est l'isoforme constitutive, exprimée par une grande variété de cellules à l'état basal afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. COX2 est l'isoforme inductible par de nombreux stimuli, en particulier pro-inflammatoires. Plus récemment, un variant de COX1, appelé COX3 a été mis en évidence (Chandrasekharan et al., 2002). Il s'agit d'un variant d'épissage de COX1, exprimé majoritairement au niveau du cortex cérébral et du tissu cardiaque. Les isoformes de COX sont

les cibles des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et de l'aspirine. *COX1* et *COX2* partagent 60 % d'homologie de séquence (Smith et al., 2000). COX1 est localisée préférentiellement dans le réticulum endoplasmique, alors que COX2 est localisée en zone périnucléaire.

Le promoteur du gène *COX2* présente les caractéristiques des gènes « à réponse immédiate », contenant une boîte TATA, et des sites de fixation de facteurs de transcription tels que NF-IL-6, AP-2, NF-κB, CRE/E-box… (Murakami and Kudo, 2004). L'induction de COX2 intervient alors en réponse à divers stimuli pro-inflammatoires (cytokines, facteurs de croissance). Les COX sont impliquées dans de nombreux processus tels que la prolifération et la réparation cellulaire, la tumorigénèse, l'ulcération gastro-intestinale, la régulation de la fonction rénale ou du métabolisme osseux, la douleur (Smith et al., 2000).

L'implication de COX2 dans la folliculogénèse a largement été démontrée grâce à des modèles *in vitro* et animaux. Tandis que les souris invalidées pour COX1 sont normalement fertiles (Langenbach et al., 1995), les souris COX2-/- montrent de nombreuses anomalies reproductives chez les femelles, notamment des défauts d'ovulation, de fécondation, d'implantation et de décidualisation, tandis que la maturation folliculaire semblait normale (Dinchuk et al., 1995) .

L'expression de COX2 est induite par les gonadotrophines dans les cellules de la granulosa des follicules pré-ovulatoires de rongeurs et de bovins, provoquant une augmentation de production de PGE2 (Sirois, 1994; Sirois et al., 1992). L'induction de COX2 chez les rats est très rapide, de l'ordre de 2 à 4 heures post-traitement par hCG , et précède la rupture folliculaire d'environ 10 heures (Sirois et al., 1992). Par contre l'induction de COX2 et la sécrétion de prostaglandines dans les follicules bovins survient seulement 18 heures après traitement par hCG, mais toujours 10 heures avant l'ovulation (Bridges et al., 2006; Sirois, 1994). De plus, les souris COX2-/- dont la synthèse de PGE2 par les cellules de la granulosa est très réduite, présentent une absence d'expansion du COC et un échec d'ovulation (Lim et al., 1997).

Chez les femmes, l'ARNm de COX2 a été détecté dans les cellules de la granulosa, et la protéine a été quantifiée dans les liquides folliculaires recueillis au cours de FIV (Narko et al., 1997; Tokuyama et al., 2003).

L'induction de COX2 par la LH ou la FSH dans les cellules de la granulosa en période pré-ovulatoire a été montrée. Mais d'autres facteurs ont la capacité d'induire son expression dans ces cellules tels que le TGF-α, GnRH, IL-1β et bien sûr GDF-9, suggérant que l'ovocyte lui-même peut induire l'expression de COX2 (Elvin et al., 1999a; Joyce et al., 2001; Sirois et al., 2004).

Ces études démontrent le rôle primordial de COX2 pendant la période pré et post-ovulatoire, via la sécrétion de PGE2.

7.3.2. Les prostaglandines E synthases

Trois isoformes enzymatiques permettent la synthèse de PGE2 à partir de PGH2. Deux isoformes constitutives, l'une cytosolique cPGES, et l'autre membranaire ou microsomale mPGES2, et une isoforme inductible mPGES1, assurent la production de PGE2. Les isoformes constitutives (cPGES et mPGES2) sont exprimées à l'état basal et sont présentes dans le cytosol de la cellule. En se couplant préférentiellement à COX1, ces enzymes permettent une réponse immédiate à l'inflammation, le relai étant pris par les isoformes enzymatiques inductibles (Tanioka et al., 2000). La Figure 12 résume la voie de synthèse de la PGE2.

L'isoforme inductible (mPGES1) est la seule isoforme inductible en situation inflammatoire et requiert un cofacteur, le glutathion, pour exercer son activité (Jakobsson et al., 1999; Murakami et al., 2000). Elle appartient à la famille des MAPEG (membrane-associated proteins involved in eicosanoid and GSH metabolism). Après un stimulus inflammatoire, l'expression de mPGES1 et COX2 est augmentée et les deux protéines effectuent une translocation à la membrane nucléaire. Cette proximité périnucléaire permet leur couplage (Murakami et al., 2000), COX2 convertissant l'acide arachidonique en PGH2, et mPGES1 synthétisant le produit final, entrainant une sécrétion importante de PGE2 (Figure 13). L'expression de mPGES1 est augmentée, comme COX2, en réponse aux stimuli inflammatoires (LPS, cytokines), afin de permettre la sécrétion de PGE2.

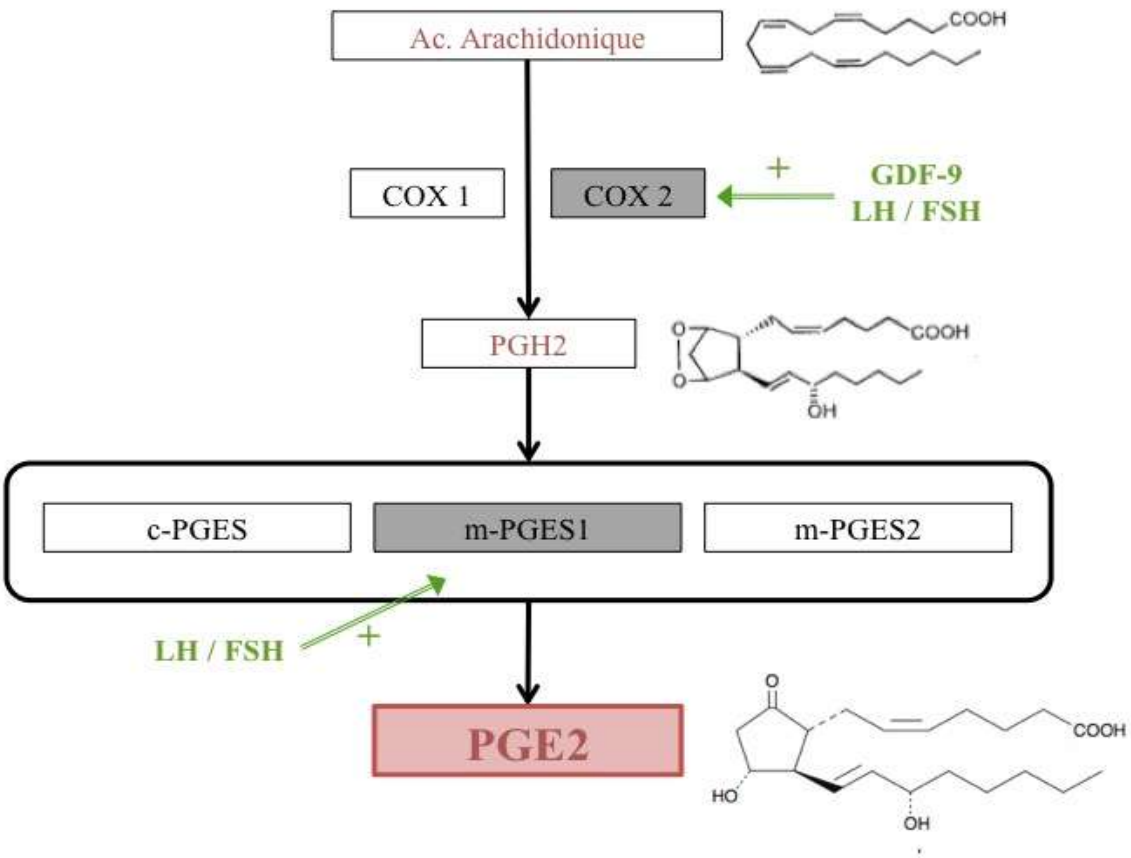


Figure 12 : Voie métabolique de synthèse de PGE2. Les enzymes inductibles sont grisées.

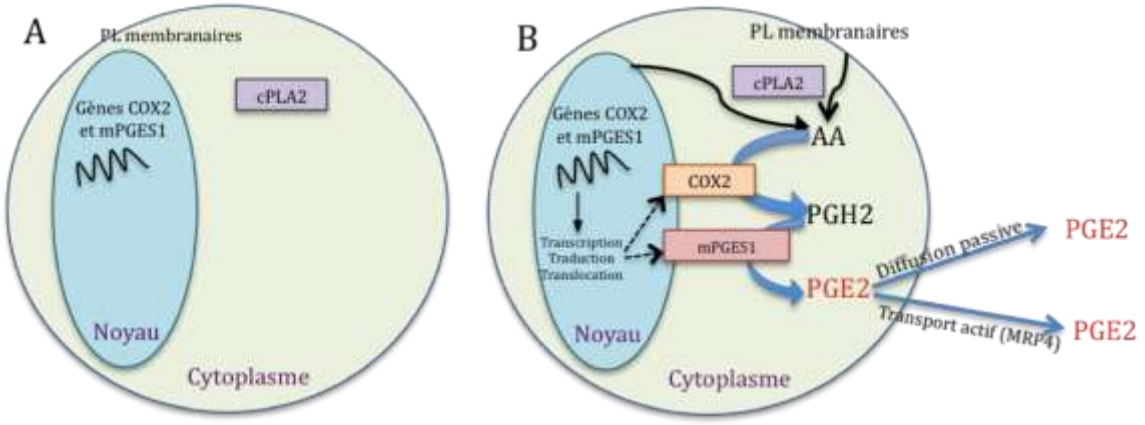


Figure 13 : Couplage enzymatique de COX2 et mPGES1. A : Cellule non stimulée. B : Cellule en situation inflammatoire (d'après Park et al., 2006).

Au niveau ovarien, mPGES1 est l'isoforme hautement exprimée dans les cellules de la granulosa après stimulation par les gonadotrophines (Duffy et al., 2005b; Filion et al., 2001). Ces données indiquent une augmentation de l'expression de mPGES1 dans les heures précédant l'ovulation. Ceci permet son couplage avec COX2 dans les cellules de la granulosa, et la synthèse importante de PGE2 avant l'ovulation.

7.4. Transport et métabolisme de la PGE2

Nouvellement synthétisée, la PGE2 va franchir la membrane phospholipidique, soit passivement, soit grâce à un transporteur actif, le Prostaglandin Transporter (PGT), échangeur anionique lactate/PGE2, (Banu et al., 2003; Kanai et al., 1995; Lu et al., 1996), en association avec la protéine MRP4 (Multidrug Resistance Protein) (Reid et al., 2003). En effet, malgré sa nature lipidique, la PGE2 se trouve fréquemment sous forme anionique, ce qui entrave sa diffusion passive (Schuster, 2002).

Comme la plupart des eicosanoïdes, la PGE2 n'est pas préformée dans un réservoir cellulaire. Lorsque la cellule est activée, la PGE2 est synthétisée *de novo* à partir de l'AA, et relarguée dans l'espace extra-cellulaire. *In vivo,* la PGE2 est rapidement convertie en un métabolite inactif (13,14-dihydro-15-keto PGE2) par la 15-OH prostaglandine déhydrogénase (Hamberg and Samuelsson, 1971). La concentration plasmatique de PGE2 est de 3 à 12 pg/mL et sa demi-vie plasmatique est d'environ 3 minutes (Fitzpatrick et al., 1980).

7.5. Récepteurs de la PGE2 et voies de signalisation intracellulaires

La PGE2 agit par l'intermédiaire de ses 4 récepteurs spécifiques (EP) couplés à des protéines G : EP1, EP2, EP3, EP4. Ce sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires qui appartiennent à la superfamille des récepteurs de type « rhodopsine » couplés aux protéines hétérotrimériques G. Chaque récepteur est codé par un gène différent. Une faible homologie de séquence est observée entre les séquences de ces gènes. Quelques résidus amino-acides sont

conservés dans les parties transmembranaires, et dans la seconde boucle extracellulaire des récepteurs, correspondant au site de reconnaissance pour la PGE2. La diversité des récepteurs est dûe à des variations de l'extrêmité cytosolique C terminale qui les couple à des protéines G différentes et explique leurs fonctions différentes (Breyer and Breyer, 2000; Katsuyama et al., 1997).

EP2 et EP4 induisent l'augmentation intracellulaire d'AMPc et la relaxation des muscles lisses, via la protéine Gs qui stimule l'adénylate cyclase (AC) et active la protéine Kinase A (PKA). Tandis que EP1 entraîne une augmentation intracellulaire de calcium et une contraction musculaire lisse. EP3 diminue la concentration intracellulaire d'AMPc via la protéine Gi et la relaxation des muscles lisses. Le Tableau I résume les différents signaux de transduction en fonction des types de récepteurs de PGE2.

Tableau I : Signaux de transduction par les récepteurs de PGE2 (adapté de Bos et al., 2004; Park et al., 2006)

Catégorie	Récepteur	Protéine	Action
Récepteur relaxant	EP2 EP4	Gs Gs	AMPc ↑
Récepteur contractile	EP1	Gq	Ca2+ ↑
Récepteur « mixte »	EP	Gi (souris) Gi/Gs/Go/Ga (bovins)	AMPc ↓ AMPc↓/AMPc↑/iP3↑

La diversité des actions de PGE2 résulte de l'existence de 4 récepteurs différents et d'une distribution tissulaire variable de ces récepteurs. L'expression d'EP3 et EP4 est largement répandue dans presque tous les tissus murins examinés (système nerveux central, tube digestif, utérus) (Honda et al., 1993; Sugimoto et al., 1992). Alors que l'expression d'EP1 n'a été observée que dans certains organes (rein, estomac, poumon) (Watabe et al., 1993). EP2 est le récepteur le moins exprimé parmi les récepteurs EP, mais son expression est induite en réponse à divers stimuli : le lipopolysaccharide (LPS) dans les macrophages (Katsuyama et al., 1998), les gonadotrophines dans les cellules épithéliales utérines (Katsuyama et al., 1997; Lim and Dey,

1997). A ce niveau, l'expression d'EP2 est très transitoire et correspond au « J5 de grossesse », pendant la fenêtre implantatoire du blastocyste qui est sensible à l'indométacine. Les auteurs concluaient qu'EP2 serait impliqué dans le processus d'implantation (Katsuyama et al., 1997).

Dans l'ovaire, les récepteurs EP ont été impliqués dans plusieurs processus. L'indométacine, inhibiteur de COX1 et COX2, abolit l'ovulation induite par la LH, mais un traitement par PGE2 la rétablit (Murdoch et al., 1993). Les souris femelles EP2-/- montrent une diminution de leur fertilité liée à une réduction de fréquence d'ovulation et de fécondation, et une diminution de la taille du cumulus (Kennedy et al., 1999). Hizaki *et al*. retrouvèrent ces résultats et les relièrent à un défaut d'expansion du COC (Hizaki et al., 1999). Ces auteurs suggèrent que la PGE2, via son récepteur EP2, induit l'expansion du COC indispensable à une fécondation efficace.

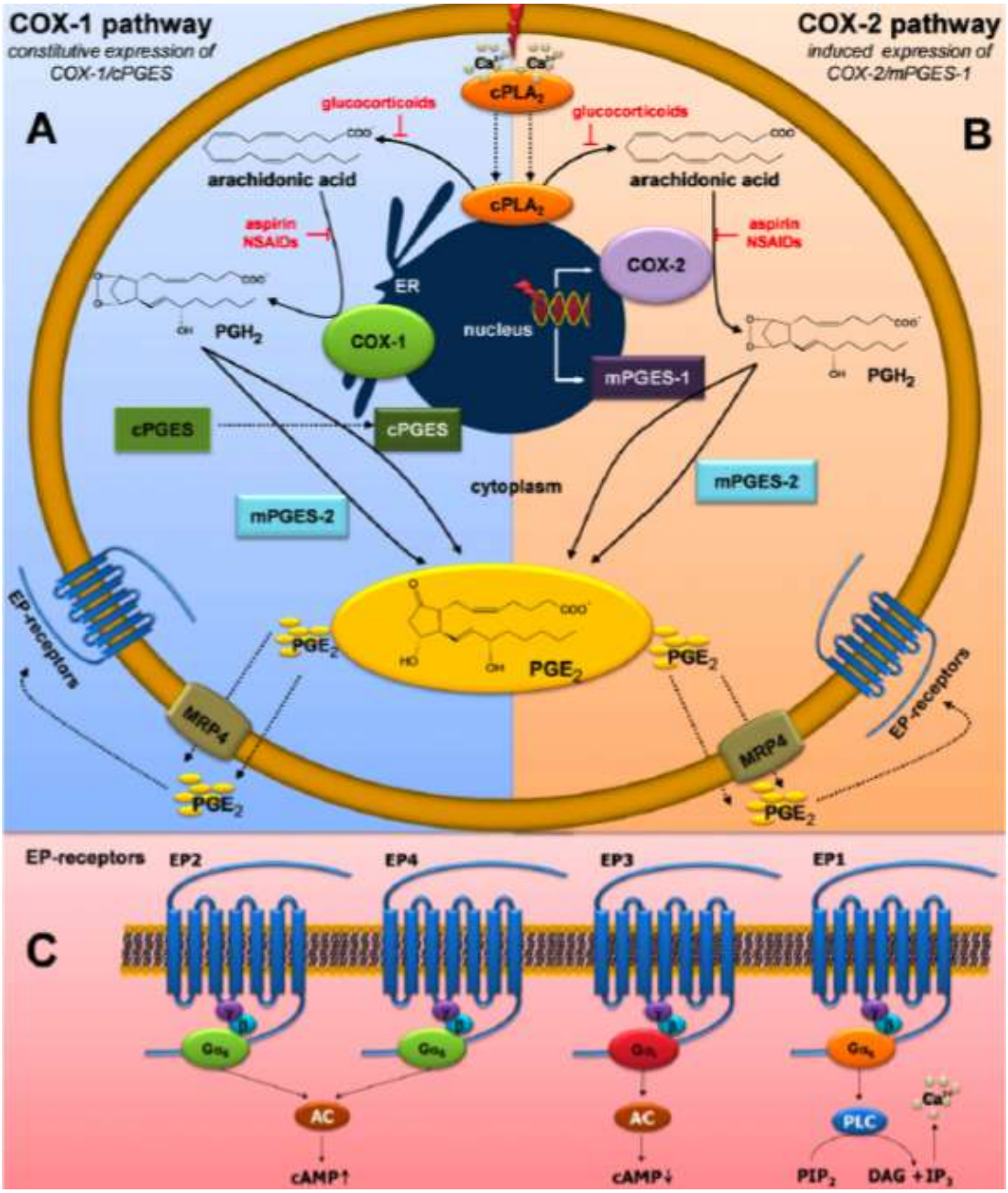


Figure 14 : Schéma récapitulatif des voies de synthèse et de signalisation de la PGE2.

La Figure 14 représente les voies de synthèse et de signalisation de la PGE2. Les parties A et B représentent respectivement la production de PGE2, constitutive ou induite par un stimulus. La partie C représente les différents récepteurs impliqués et leur activité.

7.6. Bases expérimentales déterminant le rôle de la PGE2 dans la folliculogénèse

La régulation de la production de PGE2 dans le follicule ovarien a été étudiée soit grâce à des inhibiteurs pharmacologiques des COX (sélectifs ou non) ou encore grâce à des modèles animaux invalidés pour les gènes *COX2* ou *EP2*.

7.6.1. Blocage de l'ovulation par l'inhibition de synthèse de PGE2.

L'inhibition de COX par l'indométacine bloque totalement l'ovulation dans toutes les espèces étudiées. Cette inhibition de l'ovulation, dépendante de l'indométacine, a été initialement reportée chez les rats et les lapins, mais a été ensuite observée dans plusieurs autres espèces dont les cochons, les brebis, les vaches, les singes et les humains (Armstrong, 1981). Ce résultat est aussi observé dans des ovaires de lapins et de rats, isolés, sous perfusion d'indométacine (Brannstrom et al., 1987; Hamada et al., 1977). Dans toutes ces espèces, le pic de LH entraîne une forte augmentation des concentrations de PGE2 dans les cellules de la granulosa des follicules ovariens juste avant l'ovulation. L'indométacine a la capacité d'agir directement au niveau ovarien pour bloquer cette synthèse de prostaglandines et empêcher l'ovulation (Armstrong, 1981). Les inhibiteurs sélectifs de COX2, tels que le célécoxib, ont également été utilisés *in vivo*, et entraînent une diminution de la concentration folliculaire de PGE2 (Duffy et al., 2005a). Un effet similaire a été observé chez des souris traitées par des antisérums spécifiques des PG (Lau et al., 1974).

De plus, l'anovulation observée chez ces animaux traités par indométacine, est restaurée par l'administration de PGE2 (Tsafriri et al., 1973). De même que chez les souris invalidées pour COX2, l'anovulation est corrigée par l'administration de PGE2 chez ces souris (Davis et al., 1999). La sécrétion importante de PGE2 engendrée par la régulation de COX2 avant l'ovulation apparaît essentielle pour la réalisation du processus ovulatoire.

7.6.2. Rupture folliculaire

Peters *et al.* montrèrent que la sécrétion folliculaire de PGE2 augmente dans les follicules bovins après injection de GnRH, et atteignent une concentration maximale après 24 heures de traitement. De plus, l'inhibition de synthèse de PGE2 par injection intra-folliculaire d'un inhibiteur spécifique de COX2, aboutit à des follicules présentant les caractéristiques morphologiques de follicules lutéinisés, non rompus (Peters et al., 2004). La PGE2 serait ainsi décisive au moment de la rupture folliculaire. Enfin, Li *et al*. mirent en évidence que la sécrétion massive de PGE2 (24 heures post-GnRH) dans les follicules bovins, est accompagnée d'une augmentation significative de l'expression d'enzymes protéolytiques de dégradation de la matrice extra-cellulaire permettant la rupture folliculaire (tPA). L'injection intrafolliculaire d'indométacine inhibe cette augmentation dans le liquide folliculaire. Ces résultats confirment que les PG, notamment la PGE2, sont nécessaires au mécanisme de rupture folliculaire aboutissant à l'ovulation (Li et al., 2006).

7.6.3. Expansion du COC

La PGE2 est requise pour l'expansion du COC, comme l'ont prouvées les études avec invalidation du récepteur EP2 chez les souris. Ces souris EP2-/- présentent une diminution de fertilité, contrairement aux souris invalidées pour EP1, EP3 ou EP4 (Duffy and VandeVoort, 2011). La diminution de la taille du cumulus et le défaut d'expansion du COC ont clairement été mis en cause chez ces souris (Hizaki et al., 1999; Kennedy et al., 1999).

7.6.4. Maturation méiotique ovocytaire et fécondation

Chez les primates subissant une stimulation ovarienne contrôlée, il a été récemment été montré que l'inhibition sélective de COX2 grâce au célécoxib, affecte la maturation nucléaire ovocytaire et la fécondation. Le taux d'ovocytes en métaphase II après une décharge de gonadotrophines est très diminué par un traitement oral de célécoxib, tandis que le nombre d'ovocytes aux stades de métaphase I ou vésicule germinale est significativement plus élevé. Le nombre d'ovocytes fécondés en FIV est également diminué par ce traitement (Duffy and

VandeVoort, 2011). Ceci suggère que les produits de COX2 influencent la capacité des ovocytes à compléter la méiose et à acquérir la capacité d'être fécondés.

Les injections de PGE2 chez des souris COX2-/- restaurent la poursuite de la méiose, suggérant que PGE2 est un médiateur impliqué dans le signal de maturation ovocytaire lancé par les gonadotrophines. La PGE2 restaure également le pourcentage d'ovocytes normalement fécondés en FIV et qui évoluent en embryons (Takahashi et al., 2006). Il est probable que le produit de COX2 nécessaire à la maturation nucléaire ovocytaire et à la fécondabilité ovocytaire soit la PGE2.

8. LA PROGESTERONE : PARTENAIRE DE LA PGE2 ET MEDIATEUR DE LA RELATION PARACRINE

Cette hormone stéroïdienne est sécrétée en grande quantité après l'ovulation par les cellules de la granulosa du corps jaune, et concourt au maintien précoce de la grossesse en cas de fécondation et d'implantation embryonnaire. La progestérone est alors relarguée massivement dans la circulation générale.

En période péri-ovulatoire, la progestérone joue également un rôle très important. Elvin *et al.* ont mis en évidence la production de progestérone par les cellules de la granulosa en culture (Elvin et al., 1999a). La progestérone produite est relarguée à l'extérieur des cellules et se fixe sur des récepteurs intracellulaires spécifiques (PR) d'une cellule cible. Cette hormone stéroïdienne a la capacité de diffuser passivement au travers des membranes plasmiques. Pendant la phase folliculaire, la progestérone synthétisée est majoritairement déversée dans le liquide folliculaire, peu dans la circulation générale.

Il est bien établi que l'augmentation intracellulaire d'AMPc induite par la FSH et la LH dans les cellules de la granulosa, entraîne une augmentation de l'expression de *StAR* et une phosphorylation de la protéine StAR, stimulant la synthèse de progestérone *in vivo* (Clark et al., 1995; Richards and Hedin, 1988). Elvin a montré que le GDF-9 peut induire l'expression de *StAR* dans les cellules de la granulosa, indépendamment de la FSH (Elvin et al., 2000a). Différentes

voies de signalisation sont donc impliquées pour aboutir à la production de progestérone dans ces cellules. Shimada *et al*. et Okazaki *et al.* reportèrent que des concentrations élevées de progestérone, sécrétées par les cellules du cumulus, accélèrent la reprise de méiose, sont associées à une réduction de la prolifération des cellules du cumulus, et entraînent la fermeture des jonctions communicantes entre celles-ci (Okazaki et al., 2003; Shimada and Terada, 2002a). En effet la reprise de la méiose est induite par la fermeture des jonctions communicantes, celles-ci permettant le passage de signaux inhibiteurs de la méiose du cumulus vers l'ovocyte, tels que l'AMPc (Isobe et al., 1998; Shimada and Terada, 2002b). En particulier, la réduction de l'expression des connexines 43 dans les couches de cellules de la granulosa et donc la reprise de la méiose, seraient dûes à une production de progestérone pendant cette période (Hasegawa et al., 2005). De plus, la progestérone est requise pour mener à bien le processus ovulatoire. Des souris dépourvues de PR sont totalement infertiles, car incapables d'ovuler (Lydon et al., 1996).

Il a été montré que les concentrations folliculaires de progestérone au cours de tentatives de FIV seraient corrélées à la qualité ovocytaire. Mendoza *et al.* ont démontré qu'une concentration élevée en progestérone folliculaire est associée à la capacité des ovocytes de subir une fécondation par ICSI (Mendoza et al., 1999). De même, les ovocytes normalement fécondés, ou zygotes, qui ne se clivent pas et ne se développent pas en embryons, baignent dans des liquides folliculaires dont la concentration en progestérone est plus basse que ceux qui se développent normalement (Mendoza et al., 2002) . Cependant, il n'a été rapporté aucune corrélation entre la concentration folliculaire de progestérone et la fécondation ou l'évolution en embryon (Hasegawa et al., 2005) ou le taux de grossesse (Andersen, 1993). Indépendamment de la concentration en progestérone, Hasegawa *et al*. ont montré que les embryons de bonne qualité provenaient de COC dont l'expression des récepteurs à la progestérone (PR) était diminuée (Hasegawa et al., 2005). Bien que la progestérone soit indispensable au développement d'ovocytes de bonne qualité et au processus d'ovulation, son intérêt en tant que marqueur folliculaire de qualité ovocytaire reste à ce jour controversé.

Les rôles de la PGE2 et de la progestérone sont liés pendant la période pré-ovulatoire. La progestérone est nécessaire au processus de l'ovulation et agit comme un régulateur local de l'oviducte en période péri-ovulatoire. La PGE2 joue un rôle dans la sécrétion de progestérone par les cellules de la granulosa. Armstrong a mis en évidence que la PGE2 provoque l'augmentation

intracellulaire d'AMPc dans ces cellules et favorise leur production de progestérone (Armstrong, 1981). Les concentrations folliculaires de progestérone et l'expression de ses récepteurs (PR) sont fortement augmentées après la décharge de LH dans les cellules de la granulosa et les cellules thécales, de même que les concentrations folliculaires de PGE2. Bridges *et al.* ont montré que la production de prostaglandines par la granulosa après le pic de LH, est induite par la liaison de la progestérone avec son récepteur nucléaire, entrainant l'induction de l'expression de COX2 (Bridges et al., 2006). De plus, la PGE2 a aussi la capacité de stimuler la sécrétion de progestérone par les deux types de cellules folliculaires (Fortune et al., 2009). Il existerait une boucle de régulation positive entre la PGE2 et la progestérone. Enfin, Elvin *et al*. ont montré que la synthèse de progestérone avant l'ovulation, était aussi stimulée localement par l'ovocyte via GDF-9. Le GDF-9, sans ajout de gonadotrophines, induit la voie de signalisation COX2/PGE2/EP2 dans les cellules de la granulosa et du cumulus. Cette production de PGE2, qui agit via EP2, est nécessaire à la production de progestérone (Elvin et al., 2000a). PGE2, en stimulant la synthèse de progestérone, contribue à une ovulation et une fécondation efficaces.

Ces données suggèrent que les deux molécules, la progestérone et la PGE2, contribuent ensemble à créer un micro-environnement folliculaire et oviductal favorable au déroulement de la maturation folliculaire finale et à la fécondation.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

La PGE2 apparaît désormais comme un médiateur folliculaire paracrine essentiel, sécrété en grande quantité par les cellules de la granulosa en période pré-ovulatoire. La PGE2 permet non seulement l'expansion du COC et la rupture folliculaire, mais encore la synthèse locale de progestérone et une ovulation satisfaisante. Ainsi la PGE2 et la progestérone sont deux acteurs finaux de la cascade du GDF-9, liés mécanistiquement en période pré-ovulatoire dans le follicule ovarien, qui concourent au bon déroulement de la fécondation en permettant aux ovocytes d'acquérir la capacité d'être fécondés et d'évoluer en embryon.

Le dosage de ces marqueurs dans les liquides folliculaires humains au cours de procédures d'ICSI semble intéressant dans la mesure où ils pourraient permettre de déterminer la qualité des ovocytes et/ou leur potentiel de développement embryonnaire, et ainsi améliorer la prise en charge des patients en AMP en augmentant leurs chances de succès.

L'objectif principal de ce travail a été de déterminer si la PGE2 et/ou la progestérone présentent un intérêt prédictif en terme de qualité ovocytaire dans les liquides folliculaires recueillis au cours de procédures d'ICSI réalisées chez des couples suivis dans le service d'AMP du CHU de Nantes.

MATERIELS ET METHODES

1. INCLUSION DES PATIENTES

L'étude a porté sur 18 patientes suivies entre Avril 2009 et Juin 2010 dans le service de Biologie et Médecine de la Reproduction du CHU de Nantes (Dr M. JEAN, Pr P. BARRIERE). Elles ont été sélectionnées sur les critères d'inclusion suivants :

- Une première tentative de fécondation *in vitro* avec micro-injection de spermatozoïde (ICSI),
- Une désensibilisation hypophysaire et une stimulation ovarienne par protocole agoniste ou antagoniste,
- Une ponction folliculaire après déclenchement de l'ovulation par hCG.

1.1. Protocoles de stimulation ovarienne

Pour 5 patientes, un protocole agoniste long a été suivi pour assurer la désensibilisation hypophysaire et la stimulation ovarienne. L'administration de 0,1 mg d'agoniste du GnRH DECAPEPTYL® (Ferring Co, Kiel, Allemagne) à partir du 2ème jour du cycle menstruel pendant 15 jours permettait la désensibilisation hypophysaire complète, confirmée par un dosage d'oestradiolémie bas (inférieur à 50 pg/mL) et par l'absence de kyste ovarien ou de follicule supérieur à 10 mm à l'échographie.

Pour les 13 autres patientes, un protocole de stimulation antagoniste a été suivi. L'antagoniste de la GnRH ORGALUTRAN® (Shering-Plough, Kenilworth, Etats-Unis) ou CETROTIDE® (Merck Serono, Genève, Suisse) a été débuté à la dose quotidienne de 0,25 mg, en fonction des résultats

du monitorage, lorsque le follicule le plus mature de la cohorte atteignait 14 mm, et ce jusqu'au jour du déclenchement.

La stimulation ovarienne était assurée par l'administration quotidienne soit de FSH recombinante PUREGON® (Shering-Plough, Kenilworth, Etats-Unis) ou GONAL-F® (Merck Serono, Genève, Suisse) soit de gonadotrophines ménopausiques humaines HMG MENOPUR® (Ferring Co, Kiel, Allemagne), jusqu'au déclenchement. Le type de protocole de stimulation et la dose initiale de FSH recombinante ou d'HMG ont été choisis pour chaque patiente, en fonction de son âge, de son Indice de Masse Corporelle (ou Body Mass Index BMI) et de sa réserve ovarienne évaluée par le bilan hormonal complet à J3 et le CFA à J3. Chaque patiente a bénéficié d'un monitorage du cycle selon les critères échographiques et hormonaux habituels.

1.2. Déclenchement de l'ovulation

Pour toutes les patientes, l'ovulation a été déclenchée par l'injection de 250 µg d'hCG recombinante OVITRELLE® (Merck Serono, Genève, Suisse). Les critères de déclenchement étaient la présence d'au moins 5 follicules recrutés dont 3 follicules de plus de 17 mm de diamètre, et la cohérence entre l'oestradiolémie et le nombre de follicules de diamètre supérieur à 14 mm.

2. RECUEIL DES DONNEES RELATIVES AUX PATIENTES

Les informations suivantes relatives aux patientes et aux issues de stimulation ont été relevées ou calculées :

- Caractéristiques de la population étudiée : âge, Index de masse corporelle (BMI), durée et type d'infécondité, origine masculine uniquement ou mixte de l'infertilité, consommation de tabac, bilan hormonal au 3ème jour du cycle menstruel (FSH, LH, estradiol, AMH), compte de follicules antraux (CFA) à J3.

- Caractéristiques des cycles de stimulation : rang de tentative, type de protocole utilisé, durée de stimulation, nombre d'unités de FSH injectées, oestradiolémie et nombre de follicules de plus de 14 mm le jour ou la veille du déclenchement.

- Caractéristiques des tentatives d'ICSI : utilisation de sperme « frais » ou congelé, nombre d'ovocytes recueillis, d'ovocytes matures, d'ovocytes micro-injectés, d'ovocytes normalement fécondés (présence de 2 pronuclei), taux de maturité ovocytaire (rapport entre le nombre d'ovocytes injectés et le nombre d'ovocytes recueillis), taux de fécondation (rapport entre le nombre d'embryons obtenus et le nombre d'ovocytes injectés), nombre d'embryons obtenus, qualité embryonnaire à J3 (pourcentage de « top embryons »), nombre d'embryons transférés, nombre d'embryons congelés, et pourcentage de tentatives pour lesquelles une congélation embryonnaire a eu lieu.

- Caractéristiques des issues de stimulation : taux d'annulation de transfert (rapport entre le nombre de femmes n'ayant pas bénéficié de transfert et le nombre de ponctions réalisées), nombre de tests de grossesse positifs, taux de tests positifs par ponction et par transfert, nombre de grossesses évolutives, taux de grossesses évolutives par ponction et par transfert, taux d'accouchements par ponction et par transfert.

3. RECUEIL DES ECHANTILLONS

Trente-six heures après l'administration d'hCG, la ponction ovocytaire a été réalisée au bloc opératoire sous anesthésie générale. Les ovocytes contenus dans les complexes cumulo-ovocytaires et les liquides folliculaires ont été recueillis par ponction folliculaire échoguidée par voie transvaginale.

Au sein de chaque cohorte ovocytaire, 3 ovocytes et leurs liquides folliculaires ont été choisis au hasard, individualisés, tracés afin d'être étudiés. Pour chacun de ces 3 ovocytes, le gynécologue effectuait une ponction et une aspiration folliculaires individuelles contenant l'ovocyte et son liquide folliculaire correspondant. Chaque liquide folliculaire correspondant à chaque ovocyte a été immédiatement aliquoté et conservé à -80°C, après centrifugation.

Pour permettre la réalisation de la micro-injection, chaque ovocyte recueilli a été séparé des cellules du cumulus oophorus par décoronisation mécanique et chimique par un traitement à la hyaluronidase. La maturité ovocytaire a été évaluée morphologiquement : seuls les ovocytes en métaphase II identifiés par la présence du premier globule polaire étaient retenus pour l'ICSI. La micro-injection d'un spermatozoïde du conjoint a été réalisée pour chaque ovocyte en métaphase II, 3 à 6 heures après la ponction ovocytaire par un opérateur entraîné.

Dans chaque cohorte, tous les ovocytes micro-injectés y compris les 3 ovocytes dont les liquides folliculaires avaient été prélevés individuellement, ont été évalués. Après fécondation et culture embryonnaire pendant 2 à 3 jours, la qualité embryonnaire le jour du transfert a été déterminée par le nombre de blastomères présents, leur régularité, et la proportion de fragments cellulaires anucléés. L'aspect embryonnaire est noté n (x,y).

- n correspond au nombre de blastomères.
- x correspond à leur régularité : 1 en cas de blastomères réguliers (embryon typique) ; 2 si les blastomères sont inégaux (embryon atypique).
- y correspond au taux de fragmentation embryonnaire : 1 en cas d'absence de fragment, 2 si < 20 % de fragments, 3 si l'embryon contient 20 à 50 % de fragments, et 4 si > 50 % de fragments.

Un embryon de bonne qualité ou « top embryon » est caractérisé par la présence de 4 blastomères de même taille à J2 et 8 blastomères de même taille à J3, avec un taux de fragmentation inférieur à 20 %, et l'absence de blastomères multinucléés à tous les stades de développement.

Un ou deux embryons ont été transférés dans la cavité utérine 2 à 3 jours après la ponction ovocytaire. Les embryons surnuméraires d'une qualité permettant leur congélation ont été cryoconservés au CHU de Nantes.

Le diagnostic biologique de grossesse a été réalisé onze ou douze jours après le transfert embryonnaire par le dosage quantitatif des βHCG sériques. Lorsque celui-ci était positif, une échographie objectivant une activité cardiaque fœtale *in utero* était réalisée 5 semaines après et confirmait l'existence d'une grossesse clinique évolutive.

4. EXTRACTION DES PROSTAGLANDINES

L'extraction des prostaglandines à partir des liquides folliculaires a été réalisée sur la plate-forme de spectrométrie de masse de l'Institut de Recherche Thérapeutique IRT1. L'extraction des liquides folliculaires a été réalisée en phase liquide-liquide selon un protocole mis au point précédemment.

Les étapes de l'extraction étaient les suivantes :

1. Dépôt de 500 µL de liquide folliculaire dans un tube en verre de 5 mL Supelco (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France).
2. Acidification de l'échantillon par ajout de 700 µL d'acide acétique 1M (1 mol/L). Le tube était vortexé et le pH était ensuite mesuré et ajusté pour atteindre 3 à 3,5.
3. Ajout de 2 mL de solvant organique (diethyl-éther 100%, Sigma, France), agitation au vortex (une minute) et centrifugation (3000 rpm, 10 minutes).
4. La phase organique est prélevée et transférée dans un nouveau tube de recueil en verre de 5 mL Supelco.
5. L'étape d'extraction est répétée à deux reprises sur la phase aqueuse.
6. Les phases organiques recueillies sont soumises à une évaporation et un séchage soigneux du produit d'extraction sous flux d'Azote.

Les produits d'extraction étaient conservés à -80°C jusqu'au dosage des prostaglandines.

5. DOSAGE DE LA PROSTAGLANDINE E2

Le dosage de la prostaglandine PGE2 a été effectué au moyen du kit de dosage Prostaglandin E2 EIA kit (Cayman Chemical, Estonie) utilisé selon les recommandations du fournisseur. Les produits d'extraction ont été repris dans le tampon EIA fourni par le kit avant d'effectuer le dosage.

La technique Enzyme ImmunoAssay (EIA) repose sur le principe de la compétition entre la PGE2 à doser et de la PGE2 liée à une enzyme, l'acétylcholine estérase, en présence d'un anticorps monoclonal anti-PGE2. Après incubation, la plaque est lavée et le réactif d'Ellman, le substrat de l'acétylcholine estérase, est ajouté. Le produit de la réaction enzymatique, de couleur jaune, absorbe à 412 nm. L'intensité de la coloration, déterminée par spectrophotométrie (Varioskan®, Thermo), est proportionnelle à la quantité de traceur lié, et inversement proportionnelle à la quantité de PG libre présente dans le puits pendant l'incubation.

Le calcul des concentrations été effectué grâce au programme Excel EIA Double Screenshot fourni par Cayman Chemical. Chaque échantillon a été dosé en double et la moyenne des duplicats a été prise en compte pour le calcul de la concentration en PGE2.

Les principales caractéristiques du kit de dosage utilisé sont résumées dans le Tableau II ci-dessous.

Tableau II : Principales caractéristiques du PGE2 EIA Kit - Monoclonal (Cayman Chemical).

Substrat de la réaction enzymatique Enzyme Mesure Détection		Acetylthiocholine Acetylcholine estérase Absorbance à 412 nm Spectrophotométrie
Domaine de mesure		15 pg/mL - 1000 pg/mL
Sensibilité analytique (Limite de détection)		15 pg/mL
Spécificité		PGE2 : 100 % PGE2 éthanolamide : 100 % PGE3 : 43 % PGE1 : 18,7 % 8-iso-PGE2 : 2,5 % sulprostone : 1,25 % 6-keto-PGF1α : 1 %
Reproductibilité	Précision intra essai Précision inter essai	CV : 4,2 - 10,1 % CV : 12,4 - 20,9 %

6. DOSAGE DE LA PROGESTERONE

Les dosages de progestérone dans les liquides folliculaires ont été effectués sur l'automate Cobas e 601 (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Allemagne) grâce au kit Progesterone II Elecsys selon les recommandations du fournisseur. Le test reposait sur le principe de compétition par électrochimiluminescence « ECLIA » (ElectroChimoLuminescenceImmunoAssay).

Le domaine de mesure de cette technique s'étend de 0,03 à 60 ng/mL, avec une limite de détection de 0,03 ng/mL, et une sensibilité fonctionnelle de 0,15 ng/mL.

Les échantillons de liquide folliculaire ont été dosés après avoir été dilués au 1/200ème dans du sérum humain contenant une faible quantité d'analyte, conformément aux recommandations du fournisseur du kit Progesterone II Elecsys.

7. ANALYSE STATISTIQUE

Tous les résultats sont présentés en moyennes des valeurs ± écart-type (SD). Les comparaisons de moyennes entre 2 groupes ont été réalisées grâce au test t de Mann-Whitney, ou par un test de Kruskal-Wallis suivi par un post-test de Dunn lorsque plus de 2 groupes étaient comparés, grâce au logiciel Prism 4.0 (Graphpad Software Inc, CA, USA). Les corrélations entre les concentrations folliculaires de PGE2 ou de progestérone et les paramètres clinico-biologiques féminins ou les caractéristiques des tentatives ont été réalisées grâce au test de corrélation de Spearman (ρ) grâce au logiciel Prism 4.0 (Graphpad Software Inc, CA, USA). Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque p était inférieur à 0,05.

RESULTATS

L'analyse des résultats est présentée en deux temps. La première partie est consacrée à l'analyse descriptive des caractéristiques de la population étudiée, des protocoles de stimulation ovarienne et des issues de stimulation. Dans un second temps, l'analyse des résultats des dosages de PGE2 et progestérone est présentée, d'abord en fonction des paramètres féminins, puis en fonction des caractéristiques des ovocytes dont les liquides folliculaires ont été analysés.

1. ANALYSE DESCRIPTIVE DE LA POPULATION ETUDIEE

1.1. Caractéristiques cliniques et biologiques des patientes

Dix-huit couples ont été pris en charge dans programme d'ICSI pour infertilité masculine, avec ou sans contribution d'un facteur féminin associé. Les principales caractéristiques cliniques et biologiques des patientes suivies dans cette étude sont présentées dans le Tableau III.

L'analyse des données concernant les patientes incluses dans l'étude permet de constater que la moyenne d'âge des patientes est jeune, légèrement supérieure à 30 ans (30,3 ans), et la durée moyenne d'infertilité courte, inférieure à 3 ans. La majorité des couples présente une infertilité primaire (66,7 %). Tous les couples présentent une origine masculine à l'infertilité, et dans 12 cas (67 %) une cause féminine est également retrouvée, dont 11 cas de dysovulation et un cas de syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). Toutes les patientes ont bénéficié de leur première tentative d'ICSI dans cette étude.

Tableau III : Principales caractéristiques cliniques et biologiques des 18 patientes incluses dans l'étude.

Critères cliniques	Age (ans)		30,3 ± 3,9
	Durée d'infertilité (ans)		2,9 ± 1,4
	Type d'infertilité	Primaire	12 (66,7%)
		Primo-secondaire	2 (11,1%)
		Secondaire	4 (22,2%)
	Nombre de premières tentatives		18 (100%)
	BMI (kg/m2)		22,2 ± 3,5
	Cause Féminine à l'infertilité oui/non		12/6
Critères biologiques (bilan hormonal à J3 du cycle)	FSH J3 (UI/L)		7 ± 1,9
	LH J3 (UI/L)		5,9 ± 2,7
	E2 J3 (ng/L)		38,4 ± 13,7
	AMH J3 (µg/L)		5,6 ± 4,1

L'analyse du bilan hormonal à J3 montre que les valeurs moyennes de FSH, LH, E2 et AMH se situent dans les valeurs de référence et évoque un profil hormonal normal retrouvé chez des patientes à réponse ovarienne satisfaisante.

1.2. Caractéristiques des cycles de stimulation

Les principaux paramètres de la stimulation ovarienne et de la réponse ovarienne sont résumés dans le Tableau IV ci-dessous.

Tableau IV : Caractéristiques de la stimulation ovarienne et de la réponse ovarienne pour les 18 patientes.

Rang de tentative	1
Protocole antagoniste/agoniste	13/5
Durée de stimulation (jours)	9,1 ± 1
Nombre d'unités de FSH prescrites (U)	1774,3 ± 550,5
Nombre d'unités de FSH nécessaires par ovocyte ponctionné (U)	204,2 ± 179,1
Nombre d'unités de FSH nécessaires par embryon obtenu (U)	802,1 ± 784,6
Estradiol sérique le jour ou la veille du déclenchement (pg/mL)	2111,3 ± 1106,1
Nombre de follicules Φ > 14mm	8,7 ± 4,8
Epaisseur endomètre (mm)	8,7 ± 1,8

L'analyse des stimulations ovariennes montre qu'aucune patiente n'a bénéficié de protocole « court », 72 % d'entre elles ont bénéficié d'un protocole antagoniste, et 28 % d'un protocole agoniste. Pour 8 stimulations (44 %), la FSH recombinante utilisée était le GONAL-F® (Merck Serono, Genève, Suisse), pour 9 autres stimulations (50 %) le PUREGON® (Shering-Plough, Kenilworth, Etats-Unis) a été prescrit. Le MENOPUR® (Ferring Co, Kiel, Allemagne) n'a été utilisé que dans un seul cas (6 %). La dose quotidienne moyenne de FSH recombinante prescrite en début de stimulation était de 197 ± 42 unités. Au moment du déclenchement, les données concernant le nombre moyen de follicules recrutés (8,7 follicules), l'épaisseur moyenne de l'endomètre (8,7 mm) et l'oestradiolémie moyenne (2111 pg/mL) témoignent de stimulations ovariennes satisfaisantes.

1.3. Caractéristiques des ICSI

Les résultats des tentatives d'ICSI sont résumés dans le Tableau V.

Tableau V : Caractéristiques des ICSI pour les 18 patientes.

Nombre de tentatives sperme frais / congelé	13 / 5
Nombre d'ovocytes recueillis	13,3 ± 7,6
Nombre d'ovocytes injectés	7,9 ± 4,2
Taux de maturité ovocytaire (%)	63 ± 18,4
Nombre d'ovocytes fécondés 2 PN	3,3 ± 2,6
Taux de fécondation (%)	51,4 ± 28,4
Nombre d'embryons J2/J3	3,9 ± 3
Qualité embryonnaire (% de « top embryons »)	49,8 ± 38,2
Nombre d'embryons transférés	1,7 ± 0,5
% de congélation embryonnaire	27,8 %

L'analyse des caractéristiques des ICSI montre que le nombre d'ovocytes matures, en métaphase II, par rapport au nombre d'ovocytes ponctionnés est de 63 %. Le taux de fécondation est légèrement supérieur à 50 % (51,4 %). Le nombre moyen de « top embryons » à J2/J3 atteint quasiment la moitié des embryons obtenus. Sur les 16 transferts réalisés, 69 % étaient des transferts de 2 embryons, et 31 % des transferts d'un seul embryon. Le nombre moyen d'embryons transférés est de 1,7 par transfert. Quatorze transferts (88 %) ont été effectués à J3, et 2 (12 %) à J2. Plus d'un quart des tentatives ont présenté des embryons surnuméraires dont la qualité a permis leur cryoconservation (27,8 %).

1.4. Issues de stimulation

Le Tableau VI représente les caractéristiques des issues de stimulation.

Tableau VI : Caractéristiques des issues de stimulation pour les 18 patientes.

Taux d'annulation de transfert (%)	11,1
Nombre de tests de grossesse positifs (βHCG positifs)	10
Taux βHCG positif / ponction (%)	55,6
Taux βHCG positif / transfert (%)	62,5
Nombre de grossesses évolutives	6
Taux de grossesse évolutive / ponction (%)	33,3
Taux de grossesse évolutive / transfert (%)	37,5
Taux d'accouchement / ponction (%)	33,3
Taux d'accouchement / transfert (%)	37,5

D'après le Tableau VI, deux patientes (soit 11,1 %) n'ont pas bénéficié de transfert embryonnaire. L'une en raison d'un échec de fécondation, la seconde en raison d'un syndrome d'hyperstimulation ovarienne empêchant tout transfert d'embryon « frais ». Le test de grossesse était positif chez 10 des patientes transférées (soit 62,5 %), mais 6 grossesses (soit 37,5 %) uniquement ont évolué favorablement. Deux patientes ont débuté une grossesse biochimique sans évolution par la suite (soit 12,5 % par transfert), et deux grossesses ont évolué en fausse couche spontanée (soit 12,5 % par transfert). Toutes les grossesses évolutives ont été menées à terme, dont une grossesse gémellaire issue d'un transfert de deux embryons à J3. Le taux d'accouchement par transfert dépasse ainsi les 35% (37,5 %).

1.5. Comparaison des populations « grossesse évolutive » versus « absence de grossesse évolutive

La comparaison des groupes « grossesse évolutive » vs « absence de grossesse » figure dans le Tableau VII.

Tableau VII : Comparaison des groupes "grossesse" vs "absence de grossesse" (Test t de Mann-Whitney, NS non significatif).

	Grossesse évolutive (n = 6)	**Absence de grossesse (n = 12)**	***p***
Age (ans)	30,1	30,1	**NS**
BMI (kg/m2)	20,7	23	**NS**
Durée d'infécondité (ans)	2,3	3,3	**NS**
FSH J3 (UI/L)	6,6	7,3	**NS**
LH J3 (UI/L)	4,7	6,4	**NS**
Estradiol J3 (ng/L)	39,7	37,8	**NS**
AMH J3 (µg/L)	5,1	5,8	**NS**
Nombre d'ovocytes recueillis	11	14,4	**NS**
Nombre total d'embryons à J2/J3	4,8	3,4	**NS**
Maturité ovocytaire (%)	67,6	60,7	**NS**
Taux de fécondation (%)	61,1	46,5	**NS**
% de « top embryons »	48,9	50,2	**NS**
Nombre d'embryons transférés	1,8	1,6	**NS**

Aucune différence significative n'est mise en évidence entre les deux populations (« Grossesse évolutive » vs « Absence de grossesse »).

Les caractéristiques clinico-biologiques (âge moyen, BMI moyen, durée moyenne d'infécondité ou bilan hormonal moyen à J3) ne montrent pas de différence significative entre les 2 groupes. Bien que les caractéristiques des tentatives ne présentent pas non plus de différence statistiquement significative, on observe que le nombre d'ovocytes recueillis dans le groupe « grossesse évolutive » est moins élevé que dans le groupe « absence de grossesse », mais que le taux de maturité ovocytaire y est plus élevé, ainsi que le taux de fécondation et le nombre total d'embryons à J2 ou J3. Le taux de « top embryons » à J2 ou J3 et le nombre d'embryons transférés ne diffèrent pas non plus statistiquement entre les deux groupes.

L'analyse des caractéristiques de la population incluse dans l'étude permet de montrer qu'il s'agit d'une population « standard » par rapport à la population recrutée en vue d'une tentative d'ICSI dans le service de Biologie et Médecine de la Reproduction du CHU de Nantes. Cette population présente des bilans hormonaux évoquant une réponse ovarienne favorable, et les résultats des stimulations ovariennes et des issues de stimulation sont satisfaisants.

Il est à noter qu'aucun sous-groupe ne s'individualise au sein de la population étudiée. Certaines situations cliniques auraient pu biaiser les résultats. Dans cette étude, aucune patiente n'est atteinte d'insuffisance ovarienne prématurée ou d'obésité, et une seule patiente présente un SOPK. Ainsi aucun biais de sélection n'a été mis en évidence dans cette étude.

2. ANALYSE DES DOSAGES DE PGE2 ET PROGESTERONE FOLLICULAIRES

Au total, trois liquides folliculaires par patiente ont été recueillis, soit 54 liquides folliculaires, qui ont pu être dosés pour la PGE2 et la progestérone. En Annexe sont présentées les valeurs des dosages de PGE2 et progestérone de chaque liquide folliculaire, ainsi que les vaeurs médianes et moyennes pour chaque patiente.

Dans un premier temps, nous avons analysé les concentrations folliculaires des 2 marqueurs en fonction des paramètres biologiques et cliniques des patientes ou des caractéristiques des tentatives d'ICSI. Pour cette analyse, la médiane des 3 valeurs a été utilisée pour chaque patiente. L'utilisation de la moyenne des 3 valeurs se révèle statistiquement moins pertinente que celle de la médiane de ces concentrations, plus proche de la valeur réelle. Dans un second temps, nous avons analysé les concentrations des 2 marqueurs des 54 liquides folliculaires en fonction du suivi longitudinal et du devenir de chacun des 54 ovocytes ponctionnés. Les paramètres étudiés étaient :

- La maturité ovocytaire au moment du recueil,
- La fécondation à J1 de l'ovocyte injecté,
- La qualité embryonnaire au moment du transfert.

2.1. Analyse des concentrations en PGE2 et progestérone folliculaires en fonction des données clinico-biologiques des patientes.

Nous avons analysé les concentrations folliculaires médianes de PGE2 et de progestérone en fonction des données clinico-biologiques des 18 patientes. Les résultats sont reportés dans le Tableau VIII ci-dessous.

Tableau VIII : Analyse des concentrations folliculaires médianes en PGE2 et progestérone en fonction des données clinico-biologiques des patientes. (Test du coefficient de corrélation de Spearman ρ, NS non significatif, * p significatif).

	PGE2 folliculaire (n = 18)		Progestérone folliculaire (n = 18)	
	ρ	***p***	ρ	***p***
Age	-0,08	**NS**	0,11	**NS**
AMH J3	-0,35	**NS**	-0,49	**0,047 ***
FSH J3	-0,05	**NS**	0,12	**NS**
BMI	-0,09	**NS**	0,23	**NS**

L'analyse du Tableau VIII permet de constater que les concentrations médianes de PGE2 folliculaires ne sont pas corrélées à l'âge des patientes, à l'AMH sérique à J3 ou à la FSH sérique à J3. De même, la concentration de PGE2 folliculaire n'est pas corrélée au BMI. De plus, le tabagisme féminin n'a pas d'impact sur la concentration folliculaire médiane de PGE2 ou progestérone (données non représentées).

Il est à noter que la concentration folliculaire de progestérone est inversement corrélée à l'AMH sérique à J3 des patientes. Des concentrations sériques plus faibles en AMH, reflet de la réserve ovarienne et d'une production par des follicules pré-antraux et antraux, sont observées chez les femmes ayant une concentration médiane folliculaire élevée en progestérone.

2.2. Analyse des concentrations en PGE2 et progestérone folliculaires en fonction des caractéristiques des tentatives

Nous avons analysé les concentrations folliculaires médianesde PGE2 et de progestérone en fonction des caractéristiques des 18 tentatives d'ICSI. Les résultats sont reportés dans le Tableau IX ci-dessous.

Tableau IX : Analyse des concentrations folliculaires médianes en PGE2 et progestérone en fonction des caractéristiques des tentatives d'ICSI. (Test du coefficient de corrélation de Spearman ρ, NS non significatif).

	PGE2 folliculaire (n = 18)		Progestérone folliculaire (n = 18)	
	ρ	***p***	ρ	***p***
Durée de stimulation	0,03	**NS**	0,29	**NS**
Unités de FSH prescrites	-0,22	**NS**	0,24	**NS**
Nombre d'ovocytes recueillis	0,36	**NS**	-0,21	**NS**
Nombre d'ovocytes injectés	0,39	**NS**	-0,23	**NS**
Nombre d'ovocytes fécondés 2 PN	0,39	**NS**	0,02	**NS**
Maturité ovocytaire (%)	0,03	**NS**	0,03	**NS**
Nombre d'embryons J2/J3	0,26	**NS**	-0,07	**NS**
Taux de fécondation (%)	-0,25	**NS**	0,12	**NS**
% de « top embryons » J2/J3	0,39	**NS**	0,08	**NS**
Nombre d'embryons transférés	0,09	**NS**	-0,03	**NS**

L'analyse du tableau IX permet d'affirmer que les concentrations folliculaires médianes des 3 liquides en PGE2 et progestérone ne sont statistiquement pas corrélées aux caractéristiques des tentatives d'ICSI menées dans cette étude ($p > 0,05$). La durée de stimulation, le nombre d'unités de FSH recombinante utilisées, le nombre d'ovocytes recueillis, le nombre d'ovocytes micro-injectés, le nombre d'ovocytes normalement fécondés, le taux de maturation ovocytaire, le nombre d'embryons obtenus, le taux de fécondation, le taux d'embryons de bonne qualité et le nombre d'embryons transférés ne semblent pas être influencés par la concentration folliculaire médiane de PGE2 ou progestérone.

Toutefois l'interprétation de ces résultats doit tenir compte du fait que l'analyse a été réalisée grâce à la médiane des concentrations folliculaires en PGE2 et progestérone alors que la qualité ovocytaire au sein d'une même cohorte d'ovocytes ponctionnés varie considérablement.

Il a donc semblé pertinent de s'intéresser à tous les liquides folliculaires recueillis, et d'interpréter les concentrations folliculaires de PGE2 et progestérone en fonction du suivi longitudinal et du devenir des 54 ovocytes correspondants (maturité nucléaire, fécondation, développement et qualité embryonnaire).

2.3. Analyse des concentrations en PGE2 et progestérone folliculaires

Nous avons recueilli au total 54 liquides folliculaires, pour lesquels les dosages en PGE2 et progestérone ont été réalisés. L'analyse de ces dosages a permis de constater que la concentration en PGE2 était hétérogène dans les liquides folliculaires : elle variait entre 42,6 pg/mL et 10345 pg/mL. Tandis que la concentration folliculaire en progestérone était plus homogène et s'étendait de 2190 ng/mL à 30600 mg/mL (voir Annexe).

Nous avons complété l'analyse des dosages par une étude de corrélation réalisée entre les 2 paramètres. La Figure 15 représente la corrélation entre les concentrations folliculaires en PGE2 et progestérone.

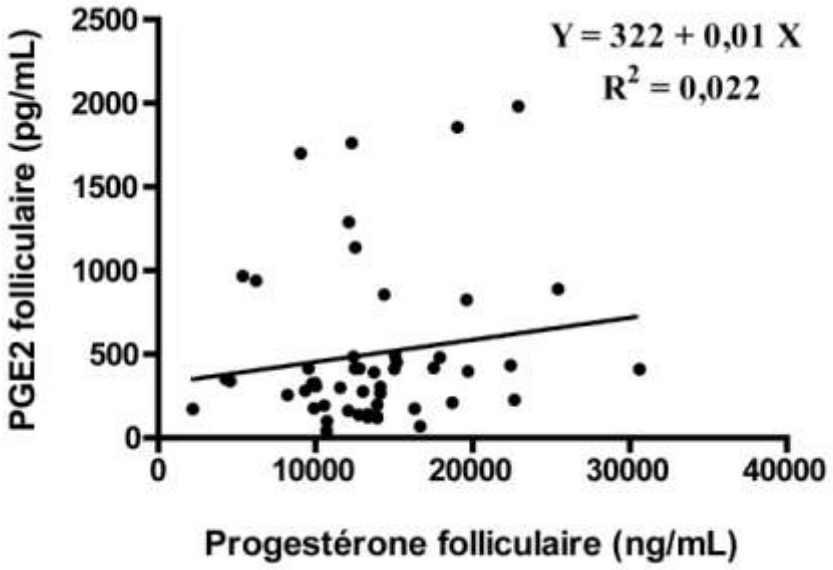


Figure 15 : Corrélation entre les concentrations folliculaires en PGE2 et progestérone. Test du coefficient de corrélation de Spearman $\rho = 0,14$; p = non significatif.

L'analyse de la Figure 15 permet d'affirmer qu'aucune corrélation statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les concentrations folliculaires en PGE2 et progestérone dans notre étude ($p > 0,05$).

2.4. Analyse des concentrations en PGE2 et progestérone folliculaires en fonction de la maturité ovocytaire

Nous avons classés individuellement les 54 ovocytes recueillis en fonction de leur maturité. Parmi ces 54 liquides folliculaires, 6 ovocytes n'ont pas été retrouvés dans le COC, et n'ont pas été pris en compte pour l'analyse. Quarante-huit liquides folliculaires correspondant aux 48 ovocytes présents dans le COC, ont donc été classés en fonction de leur maturité.

Deux groupes ont été constitués : d'une part les ovocytes matures, en métaphase II, et qui ont été micro-injectés, et d'autre part tous les ovocytes n'ayant pas été micro-injectés, c'est-à-dire les ovocytes lysés par la hyaluronidase, les ovocytes au stade de vésicule germinale et les ovocytes en métaphase I. Cette deuxième catégorie constitue le groupe des ovocytes « immatures ».

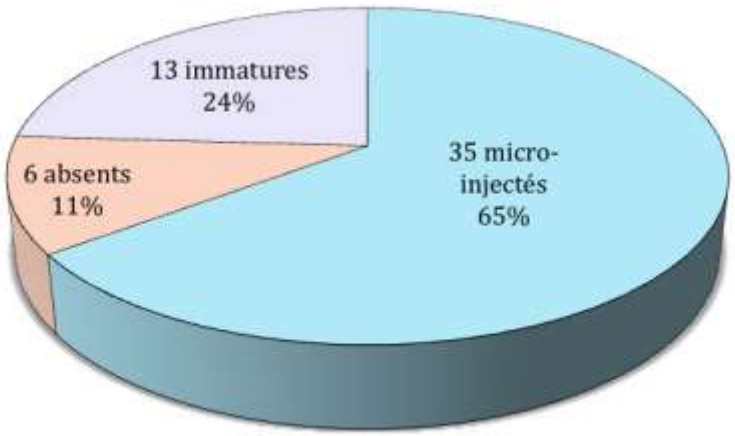


Figure 16 : Répartition des ovocytes recueillis en fonction de la maturité ovocytaire.

Parmi les 48 ovocytes recueillis, 35 étaient matures et ont été micro-injectés, tandis que 13 ovocytes ont été soit lysés par la hyaluronidase, soit présentaient une immaturité nucléaire (Figure 16). La Figure 17 représente les résultats des concentrations en PGE2 et progestérone en fonction du statut des ovocytes au moment du recueil (mature ou immature) respectivement.

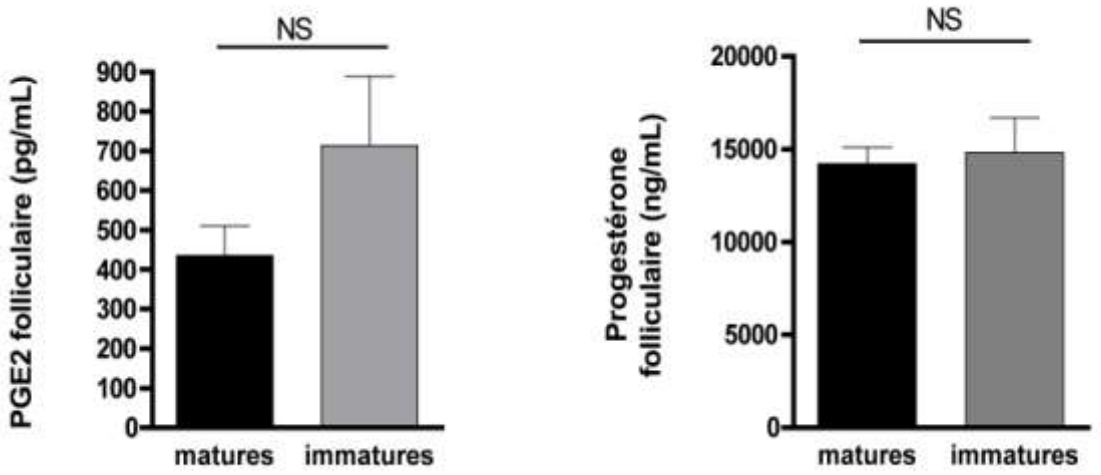


Figure 17 : Concentrations folliculaires de PGE2 et de progestérone en fonction de la maturité des ovocytes recueillis. (n = 35 ovocytes matures, n = 13 ovocytes immatures). t test de Mann-Whitney, NS non significatif.

L'analyse des résultats permet d'affirmer qu'il n'existe aucune différence significative entre les ovocytes matures et immatures en terme de concentrations folliculaires moyennes de PGE2 et de progestérone ($p > 0,05$). Dans cette étude, les concentrations en PGE2 ou en progestérone folliculaires ne semblent pas être influencées par la maturité ovocytaire.

Toutefois, une tendance peut être observée : les concentrations folliculaires moyennes de PGE2 semblent moins élevées pour les ovocytes en métaphase II que pour les ovocytes immatures. La concentration folliculaire moyenne de PGE2 pour les ovocytes matures est de 449,6 pg/mL et de 713,9 pg/mL pour les ovocytes immatures.

Aucune tendance particulière n'a été observée en terme de concentrations folliculaires moyennes de progestérone entre les deux groupes. Pour les ovocytes en métaphase II, celle-ci est de 14209 ng/mL et de 14824 ng/mL pour les ovocytes immatures.

2.5. Analyse des concentrations en PGE2 et progestérone folliculaires en fonction de la fécondation ovocytaire

Nous avons ensuite déterminé, parmi les ovocytes micro-injectés, quels étaient ceux qui avaient été normalement fécondés à J1, et ceux qui ne l'ont pas été.

Trois groupes d'ovocytes ont été constitués. Parmi les 35 ovocytes qui ont été micro-injectés, 20 ovocytes ont présenté à J1 les signes d'une fécondation normale (présence de deux pronucléi, de deux globules polaires et d'un halo clair), 12 ovocytes n'étaient pas normalement fécondés, et 3 ovocytes étaient atrétiques (Figure 18).

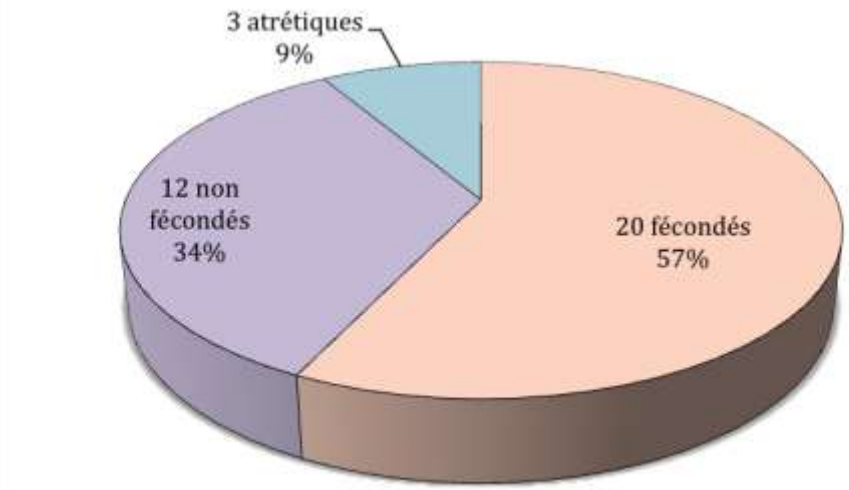


Figure 18 : Répartition des ovocytes selon le statut de fécondation après micro-injection à J1.

Les résultats des concentrations en PGE2 et progestérone folliculaires en fonction du statut de fécondation des ovocytes micro-injectés (fécondé, non fécondé ou atrétique) sont présentés sur la Figure 19.

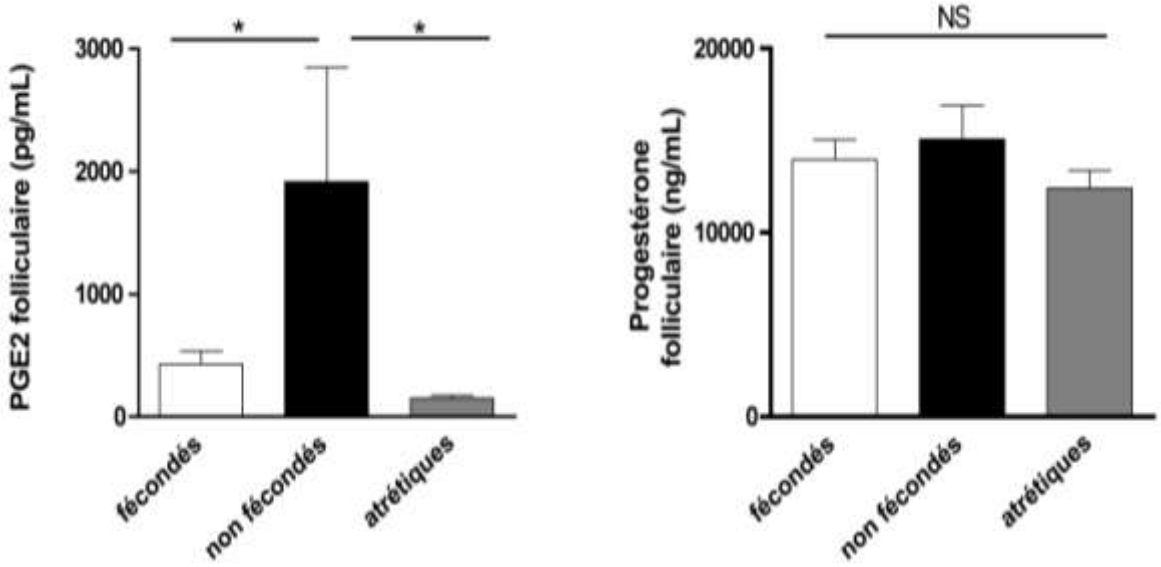


Figure 19 : Concentrations folliculaires de PGE2 et de progestérone en fonction du statut de fécondation à J1 des ovocytes micro-injectés (n = 20 ovocytes fécondés, 12 ovocytes non fécondés, 3 ovocytes atrétiques). Pour PGE2 : test de Kruskal-Wallis p = 0,016, * post test de Dunn $p < 0,05$; NS non significatif.

Les concentrations moyennes de PGE2 folliculaire sont significativement différentes entre les 3 groupes : ovocytes fécondés, non fécondés et atrétiques (p = 0,016). De plus, les comparaisons des groupes 2 à 2 montrent que les concentrations moyennes de PGE2 folliculaires sont significativement plus élevées pour les ovocytes non fécondés que pour les ovocytes fécondés ($p < 0,05$), et que pour les ovocytes atrétiques ($p < 0,05$). La concentration folliculaire moyenne de PGE2 est de 448 pg/mL pour les ovocytes fécondés, de 1913 pg/mL pour les ovocytes non fécondés et de 151 pg/mL pour les ovocytes atrétiques. Par contre, il n'existe aucune différence significative en terme de concentration folliculaire de progestérone entre les 3 groupes d'ovocytes (test de Kruskal-Wallis $p > 0,05$).

Ces résultats sont à interpréter en tenant compte du facteur masculin, car les ovocytes ont été micro-injectés avec un spermatozoïde du conjoint. La présence d'ovocytes atrétiques peut être une conséquence directe du geste de micro-injection, bien que l'opérateur l'ayant effectué soit entraîné.

2.6. Analyse des concentrations en PGE2 et progestérone folliculaires en fonction de la qualité embryonnaire

Parmi les ovocytes normalement fécondés, l'analyse de l'évolution en embryons et de la qualité embryonnaire à J2 et J3 nous a permis d'étudier l'influence des concentrations en PGE2 et progestérone sur cette qualité embryonnaire.

Trois groupes d'embryons ont été constitués. Parmi les 20 ovocytes fécondés, 6 ont évolué en embryon de très bonne qualité (classés 4,1,1 à J2 ; 6,1,1 ou 8,1,1 à J3), 11 ont évolué en embryons de qualité moindre, et 3 ne se sont pas clivés et ne se sont pas développés en embryons (Figure 20).

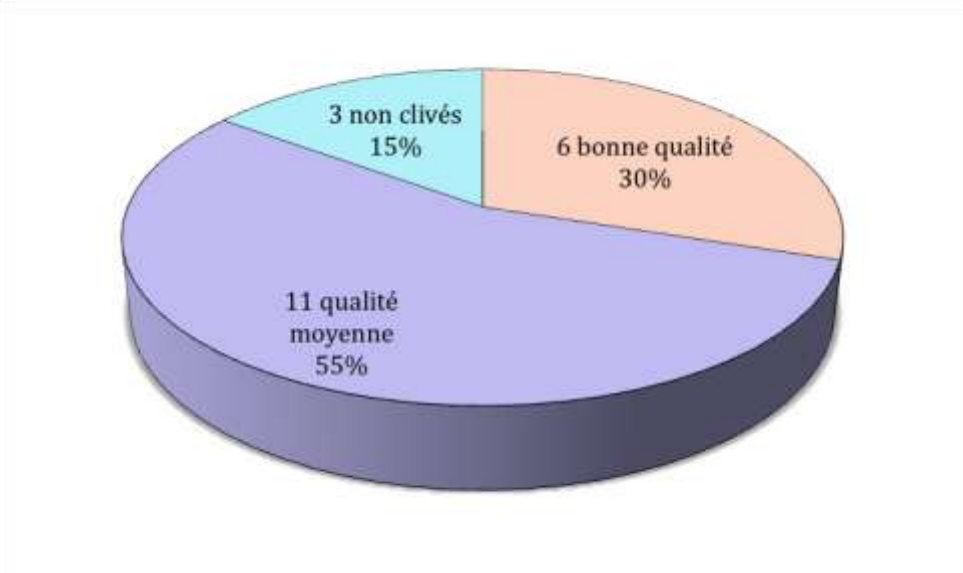


Figure 20 : Répartition des embryons en fonction de leur qualité à J2/J3

La Figure 21 représente les résultats des concentrations en PGE2 et progestérone folliculaires en fonction de la qualité embryonnaire (bonne qualité, qualité moyenne, absence de développement embryonnaire)

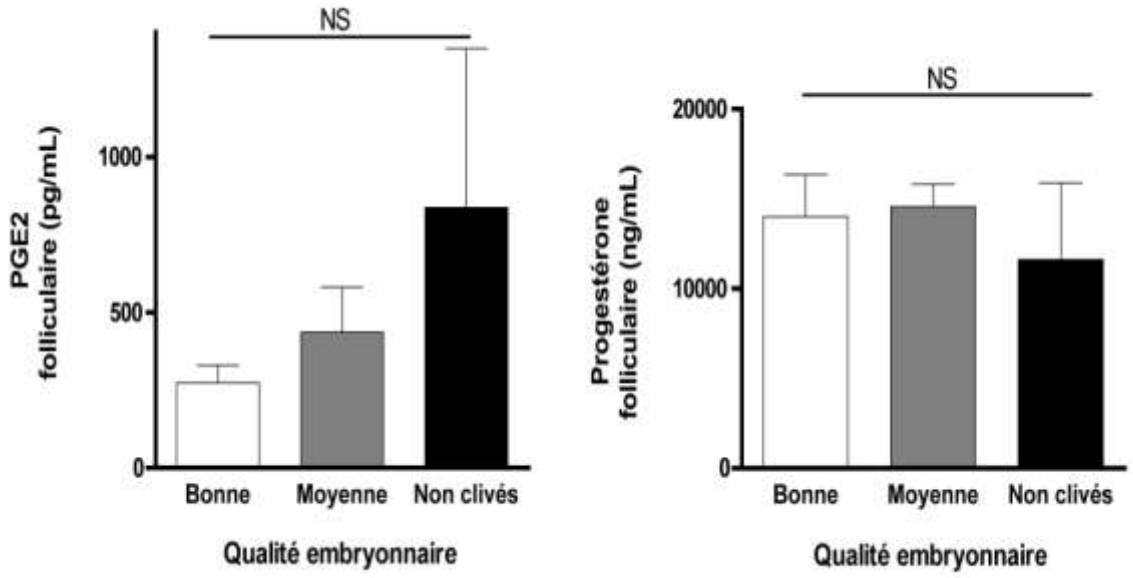


Figure 21 : Concentrations folliculaires en PGE2 et progestérone en fonction de la qualité embryonnaire à J2 ou J3 (n = 6 embryons de bonne qualité, 11 embryons de qualité moyenne, 3 ovocytes non clivés). Test de Kruskal-Wallis, NS non significatif.

L'analyse des résultats permet d'affirmer qu'il n'existe aucune différence significative de concentrations folliculaires en PGE2 ou en progestérone entre les groupes d'embryons de qualité différente ($p > 0,05$). Les concentrations en PGE2 et progestérone des liquides folliculaires ne semblent pas influencer l'évolution en embryon des ovocytes, ni leur qualité à J2 ou J3 dans cette étude. L'interprétation des résultats doit tenir compte du fait que les effectifs pour chaque catégorie sont faibles.

Toutefois, on peut observer que la concentration folliculaire moyenne en PGE2 semble augmenter tandis que la qualité embryonnaire diminue. De plus, cette concentration en PGE2 apparait plus élevée lorsque les ovocytes n'évoluent pas en embryons par rapport à ceux qui évoluent en embryons, de bonne ou moyenne qualité.

Aucune tendance particulière n'a été observée en terme de concentration folliculaire moyenne de progestérone dans les 3 groupes.

2.7. Devenir des embryons issus des liquides folliculaires étudiés.

Parmi les 17 embryons obtenus, 10 embryons (59 %) ont été transférés à 7 femmes. Cinq embryons étaient des top embryons à J3 (classés 6,1,1 ou 8,1,1), les cinq autres étaient des embryons de qualité moindre. Un seul embryon, issu des 3 ovocytes tracés, qui était classé 6,1,1 à J3 a été congelé.

Pour 4 des femmes ayant bénéficié d'un transfert, il s'agissait d'un transfert d'un seul embryon « tracé » mais de deux embryons au total ; pour les 3 autres femmes, il s'agissait d'un transfert de deux embryons tracés.

Parmi ces 7 transferts, 6 (86 %) ont abouti à un échec de la tentative, dont 3 tests de grossesse (dosage quantitatif des β-HCG plasmatiques) négatifs à J12 du transfert, 2 grossesses biochimiques et une fausse-couche spontanée.

Seul un transfert (14 %) a permis l'obtention d'une grossesse évolutive aboutissant à une naissance. Il s'agissait d'un transfert de deux embryons à J3, dont un seul était issu des 3 ovocytes analysés chez cette femme. Il est impossible de déterminer lequel des deux embryons transférés s'est implanté. Cette grossesse ne peut donc être imputée avec certitude à l'implantation de l'embryon « tracé ».

Aucune analyse statistique, sur des effectifs aussi faibles, n'est réalisable afin d'étudier les concentrations folliculaires en PGE2 et progestérone en fonction de l'issue de la tentative.

2.8. Evolution de l'effectif en fonction des paramètres étudiés.

En résumé, la Figure 22 représente l'évolution de l'effectif en fonction des paramètres étudiés à chaque stade. Pour chaque groupe, la concentration folliculaire moyenne en PGE2 est figurée.

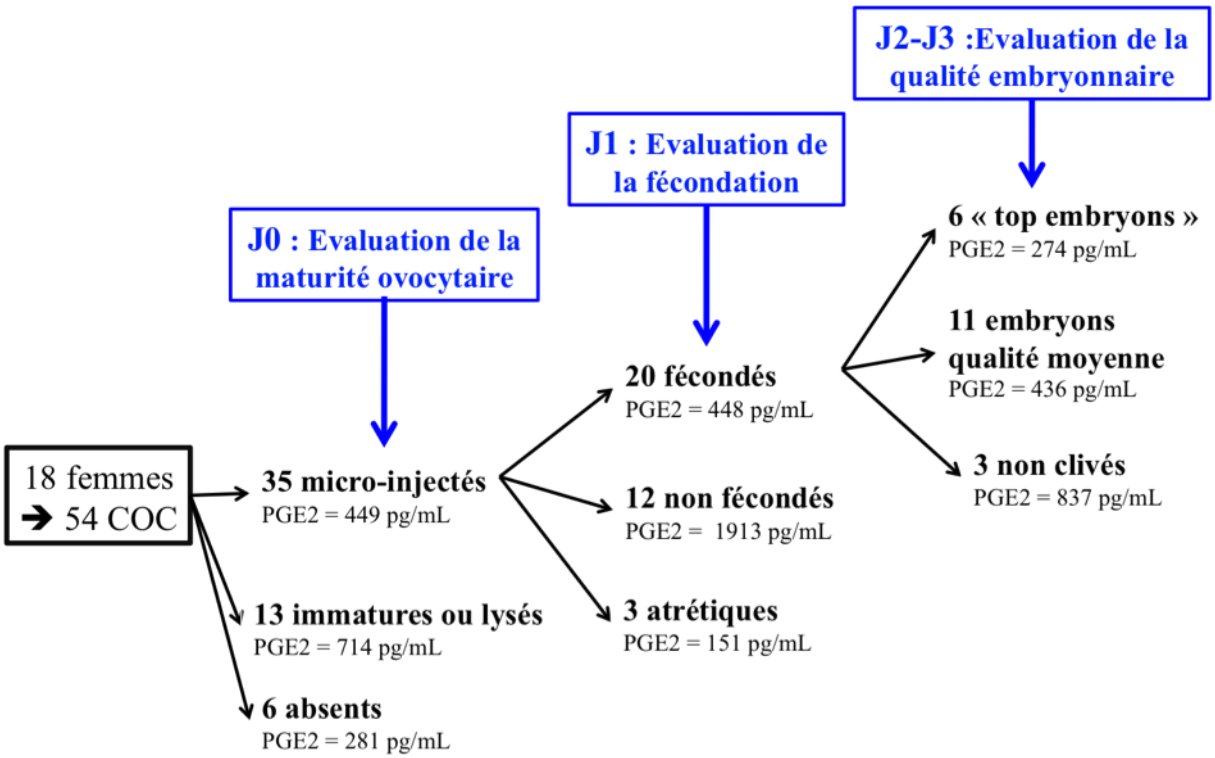


Figure 22 : Représentation schématique de l'évolution de l'effectif en fonction des paramètres étudiés. La concentration moyenne en PGE2 folliculaire est indiquée dans chaque groupe.

DISCUSSION

Cette étude s'intègre dans une série de travaux visant à caractériser le liquide folliculaire afin d'identifier des marqueurs biochimiques d'intérêt. L'objectif de ce travail était de déterminer si le dosage de la PGE2 et de la progestérone dans des liquides folliculaires, recueillis au cours de tentatives d'ICSI, pouvaient présenter un intérêt prédictif de la qualité des ovocytes ponctionnés.

Le point le plus important de cette étude concerne les concentrations folliculaires de PGE2 qui apparaissent plus faibles dans les follicules contenant des ovocytes qui seront aptes à être fécondés vs ceux qui ne le seront pas. Cependant la maturité nucléaire ovocytaire et la qualité embryonnaire à J3 ne semblent pas être influencées par ces concentrations.

La progestérone, dans cette étude, ne semble pas être un marqueur folliculaire de qualité ovocytaire.

1. ANALYSE DE LA POPULATION ETUDIEE

Les critères d'inclusion retenus, à savoir une première tentative d'ICSI proposée à des couples suivis dans le service de Biologie et Médecine de la Reproduction du CHU de Nantes entre Avril 2009 et Juin 2010, nous ont permis d'obtenir une population relativement homogène, représentative des patientes du service, sans sous-population individualisable ni biais de recrutement notable.

Toutes les patientes bénéficiaient de leur première tentative, afin d'homogénéiser au maximum la population. Les protocoles de stimulation ovarienne prescrits n'ont pas pu être adaptés en fonction d'éventuelles réponses ovariennes antérieures, et étaient fondés sur les seules données clinico-biologiques des patientes.

Le fait d'inclure uniquement des couples infertiles dont le traitement nécessitait une ICSI, présentait un intérêt majeur : l'aspect morphologique ovocytaire a été déterminé immédiatement après la ponction ovocytaire, après la procédure de décoronisation. Le statut de maturité nucléaire de chaque ovocyte au moment du recueil a pu être ainsi obtenu. Ceci n'aurait pas été possible en cas de FIV, car la décoronisation n'est effectuée qu'après fécondation éventuelle, à J1. Un ovocyte mature à J1 peut avoir complété sa maturation nucléaire en culture, ce qui aurait conduit à l'introduction de biais.

De plus, la procédure d'ICSI a été réalisée par un opérateur entrainé, et le geste en lui-même n'affecte théoriquement pas les résultats de l'étude. Bien que les résultats de l'étude doivent tenir compte du facteur masculin, le fait d'avoir inclus uniquement des couples bénéficiant d'ICSI ne peut être considéré comme un biais de notre étude. Plusieurs études ont montré que la fécondation ou le taux de grossesse, après ICSI, ne dépendent pas des paramètres spermatiques comme la concentration, la mobilité, la morphologie des spermatozoïdes, une condensation anormale de leur chromatine ou une fragmentation importante de leur ADN (Goker et al., 2002; Karydis et al., 2005; Kupker et al., 1998; Nagy et al., 1995a; Nagy et al., 1995b). Il semble qu'au cours d'une procédure d'ICSI, le facteur critique permettant le succès de la fécondation, soit l'ovocyte (Asimakopoulos et al., 2008). En utilisant l'ICSI comme unique technique de fécondation, nous pouvons postuler que la survenue de fécondation est principalement dépendante de la qualité ovocytaire. Par conséquent, nous sommes en mesure d'analyser le lien entre la concentration folliculaire de PGE2 et la survenue de fécondation.

2. DESIGN DE L'ETUDE

De multiples méthodes de sélection ovocytaire ont été envisagées. L'étude de la morphologie ovocytaire est très répandue, car elle conjugue rapidité et simplicité d'exécution. Cependant cette méthode n'est pas satisfaisante car elle conduit fréquemment à sélectionner des ovocytes dont la qualité n'est pas optimale. La spécificité de cette méthode basée sur la morphologie ovocytaire est insuffisante en termes de développement embryonnaire ou d'implantation (Balaban and Urman, 2006).

D'autres méthodes ont été rapportées. L'étude de l'expression des gènes exprimés par les cellules de la granulosa ou par l'ovocyte lui-même est possible. De nombreux gènes dont l'expression varie en fonction de la qualité ovocytaire et du potentiel implantatoire embryonnaire ont été récemment identifiés et étudiés, révélant des marqueurs ovocytaires potentiels de viabilité et de compétence (Assou et al., 2006; Patrizio et al., 2007). L'identification des ovocytes présentant des défauts chromosomiques dûs à des erreurs méiotiques, grâce à la biopsie du globule polaire, peut être utilisée pour détecter les aneuploïdies préimplantatoires (Dawson et al., 2006). Ces techniques moléculaires et génétiques sont complexes, longues, requièrent un équipement de laboratoire adapté et ne sont, par conséquent, pas applicables en pratique courante dans nos laboratoires.

Dans ce contexte, l'utilisation du liquide folliculaire comme source de marqueurs biochimiques potentiels semble judicieux, car ce milieu renferme des médiateurs solubles qui jouent un rôle critique dans la détermination de la qualité ovocytaire, dans le cadre de relations paracrines entre les contingents du COC (Revelli et al., 2009). De plus le recueil des liquides folliculaires est aisé puisqu'il est aspiré en même temps que le COC au moment de la ponction folliculaire.

Trois liquides folliculaires ont été recueillis individuellement par patiente. Une grande majorité des études s'intéressant au dosage folliculaire d'hormones ou de divers marqueurs biochimiques (cytokines…) lors de processus de FIV ou d'ICSI, utilise des liquides folliculaires poolés recueillis au cours de la ponction pour effectuer ce dosage. Les concentrations mesurées représentent alors les concentrations moyennes de la totalité des follicules aspirés. D'autres études n'analysent qu'un seul liquide folliculaire par ovaire ou même par patiente. Bien que les informations obtenues soient exploitables, ces approches négligent l'asynchronisme de développement des follicules qui entraine des compositions folliculaires différentes et des ovocytes de qualités différentes.

Le design de notre étude, en individualisant 3 follicules, permet de réaliser une analyse cohérente entre l'information obtenue par le dosage de PGE2 et de progestérone, et la qualité des ovocytes issus de ces follicules. Cette qualité a été évaluée par la maturité nucléaire de l'ovocyte correspondant, sa fécondation ou encore son potentiel de développement embryonnaire.

Toutefois, seulement 3 follicules ont été individualisés au cours de la ponction folliculaire. L'idéal aurait été de pouvoir analyser tous les liquides folliculaires de chaque follicule ponctionné, afin d'obtenir un nombre important d'échantillons de liquides folliculaires et d'augmenter la puissance de notre étude. Cette procédure présente néanmoins des inconvénients majeurs. Elle nécessite une ponction-aspiration différente pour chaque follicule, afin d'individualiser tous les échantillons. L'augmentation du nombre de ponctions aurait engendré, en plus de problèmes éthiques, des risques opératoires septiques et hémorragiques supplémentaires. Cette procédure n'était donc pas envisageable, et aucune étude effectuée sur des femmes n'a, à notre connaissance, eu recours à un tel procédé qui semble rédhibitoire.

Concernant la méthode de dosage des prostaglandines, leurs caractéristiques métaboliques créent des difficultés techniques au moment du dosage. Leur dégradation rapide à la chaleur a nécessité une conservation impérative à -80°C suivie d'une unique décongélation. Le liquide folliculaire étant très riche en protéines, une extraction des prostaglandines en phase liquide-liquide s'est avérée nécessaire avant le dosage par EIA. La technique de dosage de PGE2 utilisée, l'EIA, présente des caractéristiques satisfaisantes en terme de sensibilité et de domaine de mesure (15 à 1000 pg/mL) et a permis le dosage de tous les liquides folliculaires. Néanmoins, l'utilisation de la technique de référence pour le dosage des prostaglandines - la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) - aurait été plus appropriée (Nicolaou et al., 2009). La mise au point de cette technique est en cours sur la plateforme de Spectrométrie de Masse de l'IRT1. Cette technique nécessite également une extraction préalable des prostaglandines. Ces observations suggèrent qu'actuellement, le dosage en routine des prostaglandines demeure complexe.

3. LES MARQUEURS DE QUALITE OVOCYTAIRE

De nombreux travaux se sont intéressés à plusieurs marqueurs folliculaires potentiels et leur valeur prédictive de fécondation, de développement embryonnaire ou de grossesse. Le

nombre d'études publiées témoigne de l'intérêt de trouver le marqueur qui permettrait de sélectionner les ovocytes compétents et d'accroître les chances de succès des tentatives de FIV.

Les membres de la famille du TGF-β, tels que l'AMH, le BMP-15 et le GDF-9, ont été particulièrement étudiés en raison des rôles critiques qu'ils jouent au cours de la folliculogénèse. Les données concernant les concentrations folliculaires d'AMH sont contradictoires. Cupisti *et al.* retrouvent une corrélation positive entre les concentrations folliculaires d'AMH et le nombre d'ovocytes recueillis, et une corrélation négative entre ces concentrations et le nombre d'ovocytes en métaphase II au cours de FIV ou d'ICSI (Cupisti et al., 2007). Au contraire, Takahashi *et al*. observent une concentration en AMH 3 fois plus élevée dans les follicules contenant des ovocytes qui seront fécondés par rapport aux ovocytes non fécondés, et concluent que l'AMH pourrait être un bon marqueur prédictif de fécondation (Takahashi et al., 2008).

Concernant le BMP-15 et le GDF-9, au cours de tentatives d'ICSI des concentrations folliculaires significativement plus élevées en BMP-15 ont été retrouvées pour les ovocytes qui seront fécondés, clivés et qui évolueront en embryons de meilleure qualité (Wu et al., 2007). De plus, Gode *et al.* ont montré récemment qu'une concentration augmentée de formes matures de GDF-9 (c'est-à-dire ayant auparavant subi un clivage protéolytique) dans les liquides folliculaires issus de tentatives d'ICSI, est positivement corrélée à la maturité nucléaire ovocytaire et à la qualité embryonnaire (Gode et al., 2011). Ces études confirment le rôle déterminant de ces facteurs, qui pourraient être prédictifs de la qualité ovocytaire. Toutefois un seul liquide folliculaire par patiente a été analysé dans chaque étude. Ces résultats demandent à être confirmés par d'autres études faites sur des liquides folliculaires individualisés.

Concernant les gonadotrophines, des concentrations folliculaires élevées de FSH, LH et hCG ont été rapportées, et sont associées à une augmentation de la qualité des ovocytes recueillis (Cha et al., 1986; Ellsworth et al., 1984; Rosen et al., 2009). De fortes concentrations folliculaires de LH ont été observées pour des ovocytes conduisant à des tentatives de FIV réussies (Mendoza et al., 2002). Les gonadotrophines jouent en effet un rôle important de stimulation de la sécrétion de médiateurs solubles par les cellules de la granulosa, telles que l'acide hyaluronique. Ce

processus influence le développement et la maturation ovocytaires. Ces hormones agissent aussi en synergie avec l'estradiol (E2) pour stimuler la maturation cytoplasmique ovocytaire. Des taux folliculaires importants de gonadotrophines semblent ainsi améliorer ces processus et conduire à des ovocytes puis des embryons de meilleure qualité et augmenter les taux de grossesse. Cependant les taux folliculaires de gonadotrophines sont affectés par leurs taux circulants, ce qui pose problème lors des tentatives de FIV où les concentrations sériques de gonadotrophines sont déterminées par leur apport exogène et le degré de désensibilisation hypophysaire. De plus l'injection d'hormones différentes, HMG ou rFSH, fait varier la composition endocrine des liquides folliculaires (Smitz et al., 2007). Les concentrations folliculaires des gonadotrophines deviennent alors difficilement interprétables.

Concernant la progestérone, notre étude n'a pas permis de démontrer de relation évidente entre les concentrations folliculaires en progestérone et la maturité ovocytaire, la fécondabilité ovocytaire ou la qualité embryonnaire à J3.

Des résultats contradictoires ont été rapportés concernant les taux de progestérone folliculaire. Certains auteurs ne retrouvent pas non plus de corrélation entre la concentration folliculaire de progestérone et la fécondation ou l'évolution en embryon, mais une corrélation positive avec la qualité embryonnaire à J3 (Hasegawa et al., 2005). De même, Andersen et al ne montrent pas de lien entre ces concentrations et les taux de grossesse (Andersen, 1993). De plus, des taux élevés de progestérone ont été décrits dans les follicules contenant des ovocytes qui fécondaient anormalement (présence de plus de 2 pronucléi) et les auteurs concluent que des concentrations élevées en progestérone seraient délétères (Ben-Rafael et al., 1987). D'autres auteurs retrouvent qu'une concentration élevée de progestérone ainsi qu'un rapport Estradiol/Progestérone diminué seraient prédictifs de fécondation ovocytaire et de développement embryonnaire (Enien et al., 1995; Kobayashi et al., 1991), voire d'implantation embryonnaire et de grossesse (Basuray et al., 1988). Les auteurs considèrent ce résultat comme un reflet de la lutéinisation progressive du follicule et de la diminution de l'activité aromatase, liées à la maturation ovocytaire finale. Mendoza *et al*. ont montré qu'une concentration élevée en progestérone folliculaire est associée à la capacité des ovocytes d'être fécondés par ICSI (Mendoza et al., 1999) puis de se développer en embryon (Mendoza et al., 2002).

Toutes ces études présentent des designs différents, notamment des protocoles de stimulation ovarienne différents qui peuvent accroitre la variabilité des résultats. Dans l'état actuel des connaissances, le lien entre l'exposition des ovocytes à des taux élevés de progestérone folliculaire et la qualité ovocytaire n'est pas clairement défini.

D'autres marqueurs folliculaires ont aussi été testés, des facteurs de croissance (Insulin-like Growth Factor ou IGF), des interleukines (IL-1β, IL-2, IL-10), des protéines (leptine, α-1-antitrypsine, homocystéine, α-foeto-protéine…), ou encore des glycosaminoglycannes (acide hyaluronique). Les résultats de ces études sont contradictoires et controversés, et suggèrent qu'aucun de ces marqueurs n'est fiable pour prédire la qualité ovocytaire ou embryonnaire (Revelli et al., 2009).

Le Tableau X regroupe les résultats des principales études ayant analysé un marqueur folliculaire.

Tableau X : Résultats des principales études ayant analysé un marqueur folliculaire (+ : corrélation positive ; - absence de corrélation).

Auteur	Année	Marqueur étudié	FIV/ICSI	Nombre patientes	Nombre LF	Présence ovocyte dans COC	Nombre ovocytes recueillis	Maturité ovocytaire	Fécondation	Clivage	Qualité embryonnaire	Grossesse
Cha KY	1986	LH	FIV	18	20			+				
Mendoza C	1999	LH	ICSI	15	164			-		+	+	
Mendoza C	2002	LH	ICSI	54	54							+
Rosen MP	2009	FSH	FIV	80	143	+						
Wu YT	2007	BMP-15	ICSI	79	79				+	+	+	
Cupisti S	2007	AMH	FIV/ICSI	27	27		+	Corrélation Négative				
Takahashi C	2008	AMH	FIV	33	33				+			
Gode F	2011	GDF-9	ICSI	81	81			+			+	
Gode F	2011	BMP-15	ICSI	81	81			-			-	
Ben-Rafael Z	1987	Progestérone	FIV	ND	20				Anormale			
Basuray R	1988	Progestérone	FIV	18	18							+
Kobayashi T	1991	Progestérone	FIV	55	55				+	+		
Andersen CY	1993	Progestérone	FIV	28	28							-
Enien WM	1995	Progestérone	FIV	60	129				+			
Mendoza C	1999	Progestérone	ICSI	15	164			-	+	+	-	
Mendoza C	2002	Progestérone	ICSI	54	54					+		
Hasegawa J	2005	Progestérone	FIV/ICSI	44	135				-	-	+	
Jeremy JY	1987	PGE2	FIV	52	130			+				

La PGE2 présente un certain nombre d'avantages, dont celui d'être sécrétée *in situ* dans le liquide folliculaire par les cellules de la granulosa. D'autre part, du fait de sa concentration plasmatique évaluée entre 3 et 12 pg/mL, et de sa demi-vie plasmatique très courte (environ 3 minutes), aucune « contamination » par la circulation générale n'a pu intervenir. Les concentrations de PGE2 retrouvées dans les liquides folliculaires sont uniquement le reflet de leur production *in situ*, tandis que les hormones, cytokines et protéines quantifiées peuvent provenir de la circulation générale après passage de la barrière folliculaire.

4. LA PGE2, ACTEUR-CLE DE LA QUALITE OVOCYTAIRE ?

L'objectif principal de ce travail était de déterminer si le dosage de la PGE2 dans des liquides folliculaires, recueillis au cours de tentatives d'ICSI, pouvait présenter un intérêt prédictif de la qualité des ovocytes ponctionnés.

Dans un premier temps, aucune corrélation n'a pu être établie entre les paramètres clinico-biologiques des patientes ou les caractéristiques des stimulations, et les concentrations médianes en PGE2 des 3 liquides folliculaires. Cette analyse montre qu'il n'existe pas de lien entre cette concentration et l'âge de la patiente, sa consommation de tabac, son BMI, ou son bilan hormonal à J3. Ces résultats suggèrent que cette valeur médiane de PGE2 ne dépend pas du statut ovarien de la femme évalué par les marqueurs de la réserve ovarienne (âge, FSH à J3, AMH à J3). Cette valeur n'est pas non plus influencée par le BMI ou la consommation tabagique de la patiente. Ce constat semble en accord avec le fait que la synthèse de PGE2 s'effectue au niveau folliculaire pendant un court laps de temps, en période péri-ovulatoire. L'instabilité de la PGE2 et sa fenêtre étroite de sécrétion dans le follicule sont des éléments permettant d'expliquer l'absence de corrélation entre les caractéristiques clinico-biologiques des patientes et la valeur médiane de PGE2.

Les caractéristiques de la stimulation ovarienne (taux de maturité ovocytaire, de fécondation ou de top embryons) ne sont pas non plus corrélées aux concentrations folliculaires de PGE2. Très peu d'autres études se sont attachées à analyser la PGE2 et à la relier à la maturation ovocytaire, à la fécondation ou à la qualité embryonnaire. Notre résultat ne montre aucune corrélation, positive

ou négative, entre les concentrations médianes de PGE2 et la maturité ovocytaire évaluée sur des critères morphologiques, la fécondation ou la qualité embryonnaire. Ces résultats résultent peut-être de l'analyse faite à partir de la médiane des 3 concentrations de PGE2 chez chaque femme et de l'effectif relativement restreint de notre étude. Des études effectuées sur de plus larges populations seront nécessaires pour affiner ces résultats et confirmer ceux observés lors du suivi longitudinal de chaque ovocyte. Cette analyse faite à partir des médianes est en effet à distinguer de l'analyse faite à partir des liquides folliculaires individualisés.

Dans un second temps, nous avons analysé le devenir individuel de chacun des ovocytes dont le liquide folliculaire a été étudié, en fonction des concentrations en PGE2 correspondantes. Nous avons retrouvé des concentrations folliculaires moyennes de PGE2 significativement plus basses pour les ovocytes normalement fécondés par rapport aux ovocytes non fécondés. En outre, bien que les résultats ne montrent pas de différence significative, nous observons une tendance similaire entre les ovocytes matures (qui ont une concentration folliculaire moyenne en PGE2 plus basse) et les ovocytes immatures (qui ont une concentration folliculaire moyenne en PGE2 plus élevée). De même, les embryons de bonne qualité montrent une concentration folliculaire moyenne plus basse (273,8 pg/mL) que les embryons de qualité moindre (435,9 pg/mL). L'absence de significativité peut s'expliquer par des effectifs réduits. L'observation de ces tendances demande à être confirmée sur des cohortes plus larges.

Des résultats opposés ont été retrouvés par Jeremy *et al.* qui retrouvèrent des concentrations de PGE2 plus élevées dans les follicules contenant des ovocytes « matures » (425 pg/mL de PGE2 médiane) par rapport aux follicules contenant des ovocytes immatures (88 pg/mL de PGE2 médiane) (Jeremy et al., 1987). Toutefois la technique de dosage par RIA est moins spécifique que l'EIA, et les méthodes utilisées pour déterminer le « statut folliculaire » ne sont pas précisées. McKenzie *et al*. ont mis en évidence, au cours de tentatives d'ICSI, une augmentation de l'expression de *COX2* dans les cellules humaines de la granulosa dans les follicules évoluant en embryons de bonne qualité par rapport aux embryons de mauvaise qualité. Dans cette étude, l'expression de *COX2* serait prédictive de la maturité ovocytaire, de la fécondabilité ovocytaire et de la qualité embryonnaire (McKenzie et al., 2004). De plus, Anderson *et al*. retrouvèrent cette augmentation de l'expression transcriptionnelle de *COX2* dans les cellules de la granulosa au

cours de tentatives d'ICSI, et en ont déduit que l'expression de COX2 était positivement corrélée à la maturité ovocytaire et à la qualité embryonnaire (Anderson et al., 2009). D'après ces études, des concentrations plus élevées de PGE2 dans les follicules évoluant en ovocytes matures, fécondés et en embryons de bonne qualité pourraient être retrouvées. Cependant, Feuerstein *et al*. ont retrouvé que le développement embryonnaire tardif (obtention de blastocystes à J5-J6) était corrélé à un niveau d'expression diminué de *COX2* dans les cellules du cumulus. Les auteurs suggèrent qu'une augmentation de l'expression de ce gène aurait un effet délétère sur la compétence ovocytaire (Feuerstein et al., 2007). Ces études ne s'intéressent qu'à l'expression transcriptionnelle du gène permettant la synthèse de l'enzyme-clé de la cascade de production de PGE2, et non au produit final de cette cascade, la PGE2.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées concernant nos résultats. La cinétique de sécrétion de PGE2 dans le follicule ovarien peut être mise en cause. Plusieurs études ont montré que l'induction de COX2 et la synthèse de prostaglandines, notamment de PGE2, dans le follicule ovarien après le pic de gonadotrophines sont retardées chez les espèces présentant un long intervalle entre la décharge et l'ovulation. Sirois et al ont montré dans plusieurs espèces que l'intervalle entre l'expression de COX2 et la rupture folliculaire est hautement conservé et dure environ 10 heures (Sirois and Dore, 1997). Chez le rat, l'induction de COX2 est observée 4 heures post-hCG, la protéine a quasiment disparu après 6 heures, et l'ovulation survient 14 heures post-HCG (Sirois et al., 1992). Tandis que chez les bovins, l'induction de COX2 intervient 18 heures post-hCG, et l'ovulation au bout de 28 heures (Sirois, 1994). Chez le cheval, la protéine COX2 commence à être détectée, uniquement dans les cellules de la granulosa et non dans les cellules thécales, 30 heures après une dose d'hCG. L'induction de la protéine est maximale 36 heures après la décharge ovulatoire. Les concentrations folliculaires de PGE2 sont basses voire indétectables entre 0 et 33 heures post-hCG, et augmentent significativement après 36 et 39 heures, le pic étant atteint 36 heures post-hCG (Sirois and Dore, 1997). L'ovulation survient 39 à 42 heures après hCG dans cette espèce. Il s'avère que l'induction de COX2 joue un rôle dans la détermination de la durée du processus ovulatoire, qui diffère d'une espèce à l'autre. Ces études établissent que l'induction de COX2 par les gonadotrophines dans les cellules de la granulosa avant l'ovulation, est un mécanisme conservé dans différentes espèces, permettant la synthèse de

prostaglandines nécessaires à l'ovulation. L'augmentation importante de la synthèse de PGE2 dans les follicules avant l'ovulation est associée à l'induction « temps-dépendante » et « cellule de la granulosa-dépendante » de COX2. La Figure 23 représente les relations entre l'induction de COX2 et de PGE2 et la durée du processus ovulatoire chez différentes espèces dans le follicule préovulatoire.

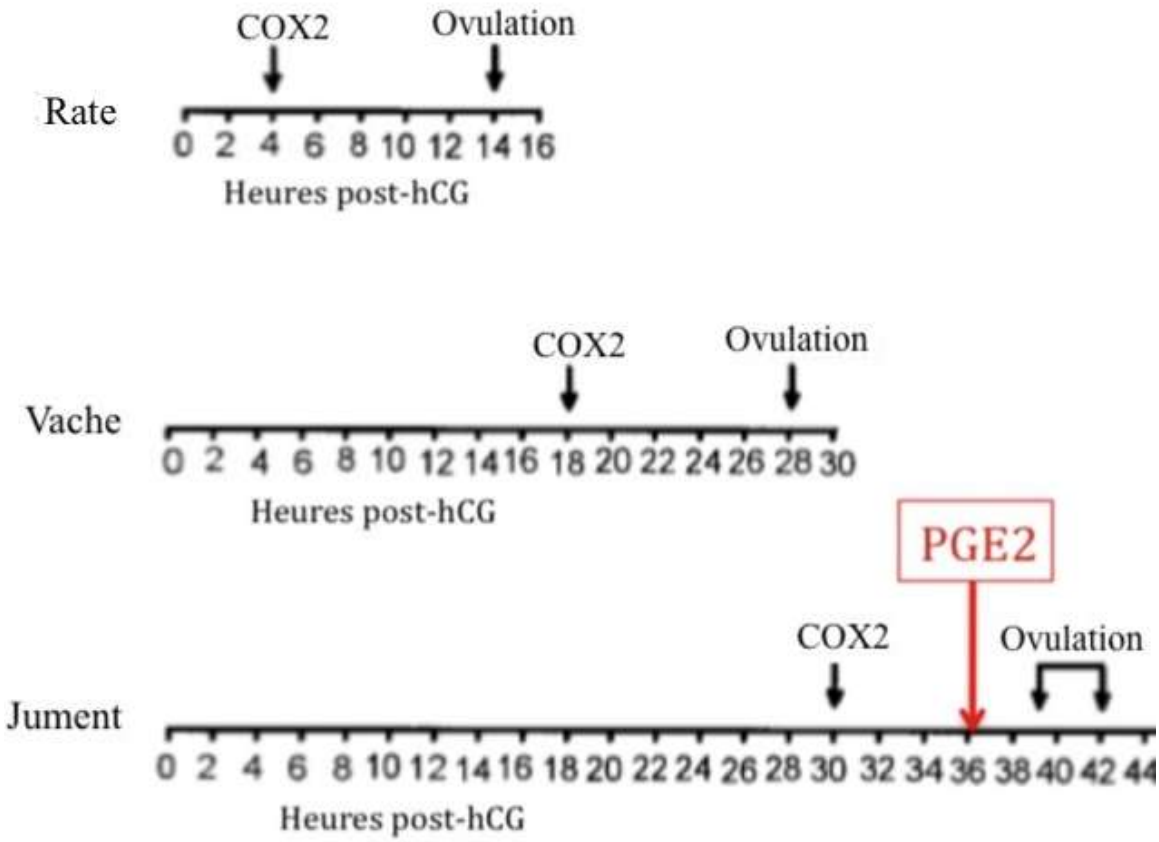


Figure 23 : Relations entre l'induction de COX2, la sécrétion de PGE2 et la durée du processus ovulatoire chez la rate, la vache et la jument dans le follicule préovulatoire (d'après Sirois and Dore, 1997; Smitz et al., 2007)

Chez les humains, la durée de la période pré-ovulatoire est de 36 à 37 heures, et la ponction folliculaire intervient environ une heure avant ce processus. Les concentrations folliculaires de PGE2 que nous avons retrouvées reflètent la production de PGE2 par les cellules de la granulosa avant l'ovulation. Le pic de production de PGE2 intervient, chez les équins, quelques heures avant l'ovulation. Des concentrations plus basses de PGE2 pourraient être retrouvées au moment

de la ponction folliculaire, après le pic de synthèse de PGE2. Ceci suggère que la cinétique de production de PGE2 est capitale pour conduire au processus ovulatoire, et que les concentrations folliculaires plus élevées retrouvées pour les ovocytes de qualité moindre, seraient le reflet de leur « retard » relatif de maturation. Les concentrations maximales de PGE2 ne seraient donc pas le reflet de la maturation ovocytaire. Après le pic de production de PGE2, des concentrations plus faibles sont attendues lorsque le processus s'est déroulé normalement. Nos résultats suggèrent que, plus que la synthèse de prostaglandines en elle-même, c'est la cinétique de production de PGE2 qui joue un rôle dans la détermination de la maturation ovocytaire finale.

Récemment, Duffy *et al.* ont montré que l'élévation de la PGE2 folliculaire retarde la maturation et la fécondation ovocytaire des souris et des singes. Ils ont aussi montré que la PGE2 peut agir directement sur des ovocytes de souris et de singes, qui expriment des récepteurs EP2 fonctionnels. Dans cette étude, des ovocytes au stade de vésicule germinative, dénudés, sont cultivés en présence et en l'absence de PGE2. Les ovocytes sont ensuite classés après 30 heures de culture, en ovocytes immatures (VG, MI) ou matures (métaphase II). Les auteurs observent une diminution significative du nombre d'ovocytes matures (en métaphase II) en présence de PGE2, puis un taux de fécondation nettement diminué, chez les singes uniquement, en présence de PGE2 (20% de la cohorte ovocytaire fécondée en présence de PGE2 versus 80 % en l'absence de PGE2) (Duffy et al., 2010). Les auteurs suggèrent que le traitement par la PGE2 retarde la progression méiotique ovocytaire, via une production intracellulaire importante d'AMPc. De fortes concentrations cytoplasmiques d'AMPc seraient en effet en cause dans l'absence de reprise méiotique, qui nécessite des concentrations faibles d'AMPc (Mehlmann, 2005). Les effets de ce retard de reprise de la méiose dû à de fortes concentrations folliculaires de PGE2 seraient, selon Duffy *et al*., plus prononcés chez les espèces ayant un long intervalle entre le pic de LH et l'ovulation, comme les singes ou les humains (Duffy and VandeVoort, 2011). Ces résultats sont en accord avec notre étude qui montre des concentrations folliculaires de PGE2 plus élevées pour les ovocytes de qualité moindre.

Finalement, il est donc envisageable que chez les femmes, l'augmentation rapide de l'expression de COX2 dans les cellules de la granulosa, soit suivie par une augmentation de l'expression de mPGES1 légèrement retardée, le pic d'expression de COX2 intervenant environ

10 heures avant l'ovulation. La synthèse de PGE2 est permise dans le liquide folliculaire grâce au couplage enzymatique de COX2 et mPGES1 au sein des cellules de la granulosa. Le maximum de production folliculaire de PGE2 interviendrait quelques heures avant l'ovulation, permettant l'expansion du COC, la synthèse locale de progestérone et le contrôle de la progression méiotique ovocytaire, puis la rupture folliculaire. Ce phénomène de contrôle de la cinétique de la maturation ovocytaire finale pourrait expliquer pourquoi des concentrations élevées en PGE2 ont été retrouvées dans les liquides folliculaires contenant des ovocytes de moins bonne qualité. Des concentrations folliculaires en PGE2 élevées seraient ainsi susceptibles d'altérer la qualité des ovocytes en retardant leur maturation méiotique. La Figure 24 représente cette hypothèse.

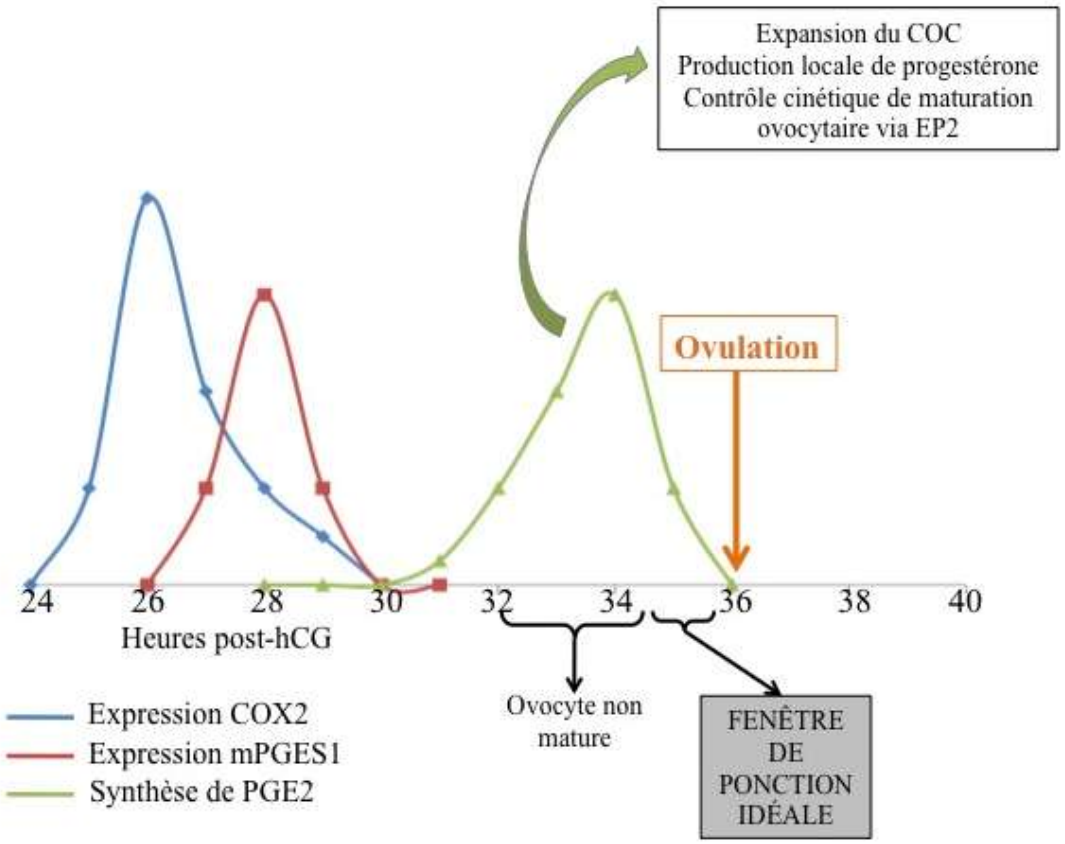


Figure 24 : Hypothèse de régulation de la cinétique de la production folliculaire de PGE2 et son impact sur la maturation ovocytaire finale.

Cette hypothèse pourrait être confortée par l'analyse transcriptionnelle de l'expression de COX2, de mPGES1 et d'EP2 dans les cellules de la granulosa. En effet, lors de notre étude les cellules de la granulosa du COC ont également été recueillies et congelées séparément des liquides folliculaires après centrifugation, lors des ponctions ovocytaires. Cette analyse permettrait d'évaluer le niveau d'expression transcriptionnelle de *COX2, mPGES1* et d'*EP2* et pourrait apporter des éléments nouveaux, confirmant et éclairant les résultats obtenus avec le dosage de la PGE2.

Une autre hypothèse voudrait que la sécrétion de fortes concentrations de PGE2 dans les liquides folliculaires soit délétère sur la maturation ovocytaire. Bien que la production de PGE2, via COX2, soit indispensable au bon déroulement de l'ovulation puis de la fécondation ovocytaire, de fortes concentrations de PGE2 pourraient être délétères sur ces processus. Ce phénomène est connu dans d'autres processus : au cours de la prolifération et de la différenciation de la barrière épithéliale intestinale, la production de PGE2 est nécessaire pour aboutir à cette barrière différenciée (Martin-Venegas et al., 2006). Mais il s'avère que PGE2, en forte concentration, devient ensuite délétère sur les cellules épithéliales intestinales et provoque la rupture de l'intégrité de la barrière (Rodriguez-Lagunas et al., 2010). La PGE2, qui est considérée comme l'un des médiateurs inflammatoires les plus efficaces, semble jouer des rôles différents en fonction de sa concentration et du type cellulaire sur lequel elle agit. Ces données suggèrent que de fortes concentrations folliculaires de PGE2 pourraient être néfastes pour la phase finale de la maturation ovocytaire et finalement altérer la qualité des ovocytes recueillis. Cependant les mécanismes moléculaires et voies de signalisation conduisant à cette altération ne sont pas connus et restent à identifier.

Pour conclure, la PGE2 en partenariat avec la progestérone, procure théoriquement un micro-environnement folliculaire permettant le développement d'ovocytes de bonne qualité. Dans cette étude, nos résultats sont cohérents avec l'implication de la cinétique de production folliculaire de PGE2 dans la régulation du processus de fécondabilité ovocytaire. De plus, les concentrations

élevées de PGE2 ne reflètent pas une meilleure qualité des ovocytes ponctionnés et pourraient même être délétères sur le développement ovocytaire pré-ovulatoire.

5. PERSPECTIVES ET IMPACT THERAPEUTIQUE

Pouvoir prédire la qualité ovocytaire et le potentiel de développement embryonnaire est un enjeu majeur de la prise en charge des couples en AMP pour permettre de sélectionner l'ovocyte et/ou l'embryon qui aura le meilleur potentiel d'implantation et ainsi d'augmenter les taux de grossesses évolutives et d'accouchements dans le cadre des transferts mono-embryonnaires. Cependant l'utilisation d'un seul marqueur folliculaire comme facteur prédictif semble à ce jour illusoire. Ce marqueur devrait comporter plusieurs avantages : fiabilité, sensibilité, spécificité, reproductibilité, rapidité et simplicité de dosage ; et aucun facteur testé à ce jour, y compris la PGE2, ne regroupe l'ensemble de ces critères. Ces dernières années, la viabilité et la qualité ovocytaires ont été analysées par des techniques de métabolomique, qui procurent un profil folliculaire détaillé des métabolites présents au moment du recueil (Revelli et al., 2009). L'analyse de ces profils pourrait permettre prochainement de déterminer des combinaisons de marqueurs, qui seraient prédictives de meilleure qualité ovocytaire et embryonnaire, ou de potentiel implantatoire augmenté. L'utilisation de plusieurs marqueurs combinés semble être une des solutions futures pour parvenir à déterminer les ovocytes de qualité optimale.

D'un point de vue thérapeutique, nos résultats confirment l'implication de la PGE2, via COX2, dans le développement ovocytaire, notamment en période pré-ovulatoire. Or les souris déficientes pour COX2 sont stériles et présentent des troubles majeurs de l'ovulation, mais aussi de fécondation et d'implantation (Lim et al., 1997). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui inhibent l'activité des cyclo-oxygénases, sont des substances très largement prescrites pour leurs propriétés anti-inflammatoires et antalgiques, et sont parmi les plus consommées actuellement. Bien que la cinétique d'expression de COX2 soit différente entre les espèces au niveau folliculaire, il est maintenant démontré que les AINS entraînent une inhibition de

l'ovulation chez toutes les espèces mammifères analysées, majoritairement dûe à l'inhibition de COX2, enzyme-clé permettant la synthèse des prostaglandines (Armstrong, 1981). Chez les rats et les bovins, l'inhibition des COX par l'indométacine perturbe la rupture folliculaire au niveau de l'apex folliculaire, causant l'anovulation (Gaytan et al., 2006; Peters et al., 2004). Chez les femmes, Pall *et al.* ont montré dans une étude randomisée en double-aveugle, que la consommation quotidienne de rofecoxib (inhibiteur sélectif de COX2) entraîne un retard significatif de la rupture folliculaire (plus de 48 heures après le pic de LH). Certaines femmes traitées par rofecoxib présentent un follicule non rompu, lutéinisé, au diamètre agrandi (30 mm vs 21 mm) (Norman, 2001; Pall et al., 2001). Ces substances sont capables de prévenir ou de retarder l'ovulation, sans influer sur les marqueurs endocrines de l'ovulation, tels que les taux de progestérone sérique (Norman and Wu, 2004). Ces résultats suggèrent que les implications cliniques de l'inhibition de COX2 sur la fertilité féminine sont importantes. La consommation d'AINS ou d'inhibiteurs sélectifs de COX2 par des femmes qui désirent une grossesse pourrait être une cause importante, fréquente et méconnue de dysfonction ovulatoire, impliquée dans un processus d'infertilité. Ainsi il convient lors d'une consultation pour infertilité d'interroger les femmes sur un éventuel traitement médicamenteux et de leur rappeler d'éviter ou de diminuer leur consommation d'inhibiteurs des COX, sélectifs ou non.

De plus, l'inhibition de la synthèse des prostaglandines pourrait être une méthode utilisée comme un moyen de contraception efficace et alternatif, avant ou après la fécondation, en bloquant l'ovulation ou l'implantation respectivement. Plusieurs études ont montré que la consommation d'inhibiteurs de COX2 (meloxicam, celecoxib) en période péri-ovulatoire entraînait un blocage de l'ovulation, sans modification des taux hormonaux (progestérone, LH, estradiol sériques), ni de perturbation de la durée du cycle menstruel (Edelman et al., 2010; Hester et al., 2010; Jesam et al., 2010). Les auteurs suggèrent qu'en l'absence d'effets secondaires notables, des inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines tels que les inhibiteurs de COX2, pourraient être utilisés en tant que contraceptifs d'urgence efficaces en période pré ou post-ovulatoire immédiate.

Dans le cadre des tentatives de FIV, l'inhibition de COX2 pourrait également permettre de diminuer l'incidence des syndromes d'hyperstimulation ovarienne (OHSS). Le syndrome d'hyperstimulation ovarienne est l'une des plus sérieuses complications de la stimulation

ovarienne contrôlée lors de procédures de FIV. Quintana *et al.* ont montré, dans un modèle murin d'OHSS, que l'injection de meloxicam diminuait significativement l'augmentation du poids des ovaires observée lors d'une hyperstimulation. Le nombre de follicules recrutés est également diminué en présence de meloxicam (Quintana et al., 2008). Dans une étude contrôlée randomisée et menée sur plus de 2400 cycles de FIV chez des femmes à haut risque d'hyperstimulation ovarienne (SOPK, antécédent d'OHSS), de faibles doses quotidiennes d'aspirine (100 mg/jour à compter du premier jour du cycle menstruel) ont permis de diminuer significativement l'incidence de ce syndrome (0,25 % de cas d'OHSS chez les femmes ayant reçu l'aspirine vs 8,4 % chez les femmes ayant reçu un placebo) (Varnagy et al., 2010). Dans cette étude les taux de grossesse ne montrent aucune différence significative entre les 2 groupes. L'aspirine pourrait non seulement permettre de réduire l'incidence des cas d'OHSS, mais aussi de diminuer le risque de développer des complications sérieuses de ce syndrome. Bien que des études supplémentaires soient désormais nécessaires pour confirmer ces résultats, ces travaux tendent à prouver que les inhibiteurs des COX peuvent trouver leur place parmi les différentes stratégies préventives des syndromes d'hyperstimulation ovarienne (Nastri et al., 2010).

CONCLUSION

En définitive, ce travail renforce le concept de la participation essentielle des prostaglandines, notamment de la PGE2, à la régulation du processus de maturation ovocytaire dans les follicules pré-ovulatoires. Nous avons mis en évidence que la concentration de PGE2 au cours de tentatives d'ICSI était plus faible dans les follicules contenant des ovocytes qui seront aptes à être fécondés, par rapport aux ovocytes qui ne seront pas fécondés. En revanche, la maturité ovocytaire et la qualité embryonnaire à J3 n'étaient pas influencées par la concentration folliculaire en PGE2. La mesure de la progestérone folliculaire, dont la synthèse en période péri-ovulatoire est capitale et est stimulée par la PGE2, n'a pas permis de mettre en évidence un lien avec la maturité ou la fécondation ovocytaires ni avec la qualité embryonnaire à J3. Il semble que la cinétique de production de PGE2, qui est induite pendant un laps de temps très court, soit un facteur-clé dans la régulation de la qualité ovocytaire.

Ce travail, de par son design novateur et les résultats obtenus, représente un outil supplémentaire dans la compréhension des mécanismes de régulation de la maturation ovocytaire pré-ovulatoire. Des études menées sur de plus amples effectifs, et complétées par des analyses transcriptomiques, devront être menées pour permettre d'affiner nos résultats et de confirmer les tendances observées.

Dans les prochaines années, le développement des techniques de métabolomique pourrait permettre d'identifier rapidement les ovocytes de qualité optimale grâce à des combinaisons de plusieurs marqueurs fiables, et devrait ainsi tendre à augmenter les chances de grossesse au cours de tentatives de FIV.

BIBLIOGRAPHIE

- Ackert, C.L., Gittens, J.E., O'Brien, M.J., Eppig, J.J., and Kidder, G.M. (2001). Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. Dev Biol 233, 258-270.
- Albertini, D.F., Combelles, C.M., Benecchi, E., and Carabatsos, M.J. (2001). Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. Reproduction 121, 647-653.
- Andersen, C.Y. (1993). Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after in vitro fertilization. J Clin Endocrinol Metab 77, 1227-1234.
- Anderson, E., and Albertini, D.F. (1976). Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. J Cell Biol 71, 680-686.
- Anderson, R.A., Sciorio, R., Kinnell, H., Bayne, R.A., Thong, K.J., de Sousa, P.A., and Pickering, S. (2009). Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilisation, embryo development and competence to establish a pregnancy. Reproduction 138, 629-637.
- Armstrong, D.T. (1981). Prostaglandins and follicular functions. J Reprod Fertil 62, 283-291.
- Asimakopoulos, B., Abu-Hassan, D., Metzen, E., Al-Hasani, S., Diedrich, K., and Nikolettos, N. (2008). The levels of steroid hormones and cytokines in individual follicles are not associated with the fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 90, 60-64.
- Assou, S., Anahory, T., Pantesco, V., Le Carrour, T., Pellestor, F., Klein, B., Reyftmann, L., Dechaud, H., De Vos, J., and Hamamah, S. (2006). The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile. Hum Reprod 21, 1705-1719.
- Balaban, B., and Urman, B. (2006). Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. Reprod Biomed Online 12, 608-615.
- Banu, S.K., Arosh, J.A., Chapdelaine, P., and Fortier, M.A. (2003). Molecular cloning and spatio-temporal expression of the prostaglandin transporter: a basis for the action of prostaglandins in the bovine reproductive system. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 11747-11752.
- Basuray, R., Rawlins, R.G., Radwanska, E., Henig, I., Sachdeva, S., Tummon, I., Binor, Z., and Dmowski, W.P. (1988). High progesterone/estradiol ratio in follicular fluid at oocyte aspiration for in vitro fertilization as a predictor of possible pregnancy. Fertil Steril 49, 1007-1011.
- Ben-Rafael, Z., Meloni, F., Strauss, J.F., 3rd, Blasco, L., Mastroianni, L., Jr., and Flickinger, G.L. (1987). Relationships between polypronuclear fertilization and follicular fluid hormones in gonadotropin-treated women. Fertil Steril 47, 284-288.
- Bergstrom, S., Diczfalusy, E., Borell, U., Karim, S., Samuelsson, B., Uvnas, B., Wiqvist, N., and Bygdeman, M. (1972). Prostaglandins in fertility control. Science 175, 1280-1287.
- Bergstrom, S., and Samuelsson, B. (1962). Isolation of prostaglandin E1 from human seminal plasma. Prostaglandins and related factors. 11. J Biol Chem 237, 3005-3006.
- Bos, C.L., Richel, D.J., Ritsema, T., Peppelenbosch, M.P., and Versteeg, H.H. (2004). Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. Int J Biochem Cell Biol 36, 1187-1205.

- Brannstrom, M., Koos, R.D., Le Maire, W.J., and Janson, P.O. (1987). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-induced ovulation in the perfused rat ovary and its mediation by prostaglandins. Biol Reprod 37, 1047-1053.
- Breyer, M.D., and Breyer, R.M. (2000). Prostaglandin E receptors and the kidney. Am J Physiol Renal Physiol 279, F12-23.
- Bridges, P.J., Komar, C.M., and Fortune, J.E. (2006). Gonadotropin-induced expression of messenger ribonucleic acid for cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins E and F2alpha in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor. Endocrinology 147, 4713-4722.
- Buccione, R., Schroeder, A.C., and Eppig, J.J. (1990a). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. Biol Reprod 43, 543-547.
- Buccione, R., Vanderhyden, B.C., Caron, P.J., and Eppig, J.J. (1990b). FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. Dev Biol 138, 16-25.
- Carabatsos, M.J., Elvin, J., Matzuk, M.M., and Albertini, D.F. (1998). Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. Dev Biol 204, 373-384.
- Cecconi, S., Ciccarelli, C., Barberi, M., Macchiarelli, G., and Canipari, R. (2004). Granulosa cell-oocyte interactions. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 115 Suppl 1, S19-22.
- Cha, K.Y., Barnes, R.B., Marrs, R.P., and Lobo, R.A. (1986). Correlation of the bioactivity of luteinizing hormone in follicular fluid with oocyte maturity in the spontaneous cycle. Fertil Steril 45, 338-341.
- Chand, A.L., Ponnampalam, A.P., Harris, S.E., Winship, I.M., and Shelling, A.N. (2006). Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. Fertil Steril 86, 1009-1012.
- Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., and Simmons, D.L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 13926-13931.
- Clark, B.J., Soo, S.C., Caron, K.M., Ikeda, Y., Parker, K.L., and Stocco, D.M. (1995). Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. Mol Endocrinol 9, 1346-1355.
- Clarke, H.G., Hope, S.A., Byers, S., and Rodgers, R.J. (2006). Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. Reproduction 132, 119-131.
- Cupisti, S., Dittrich, R., Mueller, A., Strick, R., Stiegler, E., Binder, H., Beckmann, M.W., and Strissel, P. (2007). Correlations between anti-mullerian hormone, inhibin B, and activin A in follicular fluid in IVF/ICSI patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes. Eur J Med Res 12, 604-608.
- Davis, B.J., Lennard, D.E., Lee, C.A., Tiano, H.F., Morham, S.G., Wetsel, W.C., and Langenbach, R. (1999). Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta. Endocrinology 140, 2685-2695.
- Dawson, A., Griesinger, G., and Diedrich, K. (2006). Screening oocytes by polar body biopsy. Reprod Biomed Online 13, 104-109.
- Di Pasquale, E., Rossetti, R., Marozzi, A., Bodega, B., Borgato, S., Cavallo, L., Einaudi, S., Radetti, G., Russo, G., Sacco, M., et al. (2006). Identification of new variants of human

BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. J Clin Endocrinol Metab 91, 1976-1979.

- Dinchuk, J.E., Car, B.D., Focht, R.J., Johnston, J.J., Jaffee, B.D., Covington, M.B., Contel, N.R., Eng, V.M., Collins, R.J., Czerniak, P.M., et al. (1995). Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. Nature 378, 406-409.
- Dixit, H., Rao, L.K., Padmalatha, V.V., Kanakavalli, M., Deenadayal, M., Gupta, N., Chakrabarty, B., and Singh, L. (2006). Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. Hum Genet 119, 408-415.
- Dong, J., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N., and Matzuk, M.M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. Nature 383, 531-535.
- Dragovic, R.A., Ritter, L.J., Schulz, S.J., Amato, F., Thompson, J.G., Armstrong, D.T., and Gilchrist, R.B. (2007). Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. Biol Reprod 76, 848-857.
- Driancourt, M.A., Gougeon, A., Monniaux, D., Royère, D., and Thibault, C. (2001). Folliculogenèse et ovulation. La Reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses INRA editions, 316-347.
- Drummond, A.E. (2006). The role of steroids in follicular growth. Reprod Biol Endocrinol 4, 16.
- Dube, J.L., Wang, P., Elvin, J., Lyons, K.M., Celeste, A.J., and Matzuk, M.M. (1998). The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. Mol Endocrinol 12, 1809-1817.
- Duffy, D.M., Dozier, B.L., and Seachord, C.L. (2005a). Prostaglandin dehydrogenase and prostaglandin levels in periovulatory follicles: implications for control of primate ovulation by prostaglandin E2. J Clin Endocrinol Metab 90, 1021-1027.
- Duffy, D.M., McGinnis, L.K., Vandevoort, C.A., and Christenson, L.K. (2010). Mammalian oocytes are targets for prostaglandin E2 (PGE2) action. Reprod Biol Endocrinol 8, 131.
- Duffy, D.M., Seachord, C.L., and Dozier, B.L. (2005b). Microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) is the primary form of PGES expressed by the primate periovulatory follicle. Hum Reprod 20, 1485-1492.
- Duffy, D.M., and VandeVoort, C.A. (2011). Maturation and fertilization of nonhuman primate oocytes are compromised by oral administration of a cyclooxygenase-2 inhibitor. Fertil Steril 95, 1256-1260.
- Edelman, A.B., Jensen, J.T., and Hennebold, J.D. (2010). A nonhormonal model for emergency contraception: prostaglandin synthesis inhibitor effects on luteal function and lifespan, a pilot study. Contraception 81, 496-500.
- Ellsworth, L.R., Balmaceda, J.P., Schenken, R.S., Silverman, A.Y., Prihoda, T.J., and Asch, R.H. (1984). Human chorionic gonadotropin and steroid concentrations in human follicular fluid in relation to follicle size and oocyte maturity in stimulated ovarian cycles. Acta Eur Fertil 15, 343-346.
- Elvin, J.A., Clark, A.T., Wang, P., Wolfman, N.M., and Matzuk, M.M. (1999a). Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. Mol Endocrinol 13, 1035-1048.
- Elvin, J.A., and Matzuk, M.M. (1998). Mouse models of ovarian failure. Rev Reprod 3, 183-195.

- Elvin, J.A., Yan, C., and Matzuk, M.M. (2000a). Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 10288-10293.
- Elvin, J.A., Yan, C., and Matzuk, M.M. (2000b). Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. Mol Cell Endocrinol 159, 1-5.
- Elvin, J.A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K., and Matzuk, M.M. (1999b). Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. Mol Endocrinol 13, 1018-1034.
- Enien, W.M., el Sahwy, S., Harris, C.P., Seif, M.W., and Elstein, M. (1995). Human chorionic gonadotrophin and steroid concentrations in follicular fluid: the relationship to oocyte maturity and fertilization rates in stimulated and natural in-vitro fertilization cycles. Hum Reprod 10, 2840-2844.
- Eppig, J.J. (1991). Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed in vitro from preantral follicles. Biol Reprod 45, 824-830.
- Eppig, J.J., Wigglesworth, K., and Pendola, F.L. (2002). The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 2890-2894.
- Feuerstein, P., Cadoret, V., Dalbies-Tran, R., Guerif, F., Bidault, R., and Royere, D. (2007). Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. Hum Reprod 22, 3069-3077.
- Feuerstein, P., Cadoret, V., Dalbies-Tran, R., Guerif, F., and Royere, D. (2006). [Oocyte-cumulus dialog]. Gynecol Obstet Fertil 34, 793-800.
- Filion, F., Bouchard, N., Goff, A.K., Lussier, J.G., and Sirois, J. (2001). Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation in vivo. J Biol Chem 276, 34323-34330.
- Fitzpatrick, F.A., Aguirre, R., Pike, J.E., and Lincoln, F.H. (1980). The stability of 13,14-dihydro-15 keto-PGE2. Prostaglandins 19, 917-931.
- Fortune, J.E., Willis, E.L., Bridges, P.J., and Yang, C.S. (2009). The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. Anim Reprod 6, 60-71.
- Galloway, S.M., McNatty, K.P., Cambridge, L.M., Laitinen, M.P., Juengel, J.L., Jokiranta, T.S., McLaren, R.J., Luiro, K., Dodds, K.G., Montgomery, G.W., et al. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. Nat Genet 25, 279-283.
- Gaytan, M., Morales, C., Bellido, C., Sanchez-Criado, J.E., and Gaytan, F. (2006). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and ovulation: lessons from morphology. Histol Histopathol 21, 541-556.
- Gilchrist, R.B., Lane, M., and Thompson, J.G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. Hum Reprod Update 14, 159-177.
- Gilchrist, R.B., Ritter, L.J., and Armstrong, D.T. (2004). Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. Anim Reprod Sci 82-83, 431-446.
- Gode, F., Gulekli, B., Dogan, E., Korhan, P., Dogan, S., Bige, O., Cimrin, D., and Atabey, N. (2011). Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on embryo quality. Fertil Steril 95, 2274-2278.

- Goker, E.N., Sendag, F., Levi, R., Sendag, H., and Tavmergen, E. (2002). Comparison of the ICSI outcome of ejaculated sperm with normal, abnormal parameters and testicular sperm. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 104, 129-136.
- Gougeon, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endocr Rev 17, 121-155.
- Hamada, Y., Bronson, R.A., Wright, K.H., and Wallach, E.E. (1977). Ovulation in the perfused rabbit ovary: the influence of prostaglandins and prostaglandin inhibitors. Biol Reprod 17, 58-63.
- Hamberg, M., and Samuelsson, B. (1971). On the metabolism of prostaglandins E 1 and E 2 in man. J Biol Chem 246, 6713-6721.
- Hasegawa, J., Yanaihara, A., Iwasaki, S., Otsuka, Y., Negishi, M., Akahane, T., and Okai, T. (2005). Reduction of progesterone receptor expression in human cumulus cells at the time of oocyte collection during IVF is associated with good embryo quality. Hum Reprod 20, 2194-2200.
- Hayashi, M., McGee, E.A., Min, G., Klein, C., Rose, U.M., van Duin, M., and Hsueh, A.J. (1999). Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. Endocrinology 140, 1236-1244.
- Hester, K.E., Harper, M.J., and Duffy, D.M. (2010). Oral administration of the cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor meloxicam blocks ovulation in non-human primates when administered to simulate emergency contraception. Hum Reprod 25, 360-367.
- Hizaki, H., Segi, E., Sugimoto, Y., Hirose, M., Saji, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Noda, Y., Tanaka, T., Yoshida, N., et al. (1999). Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(2). Proc Natl Acad Sci U S A 96, 10501-10506.
- Honda, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Watabe, A., Irie, A., Negishi, M., Narumiya, S., and Ichikawa, A. (1993). Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype. J Biol Chem 268, 7759-7762.
- Hreinsson, J.G., Scott, J.E., Rasmussen, C., Swahn, M.L., Hsueh, A.J., and Hovatta, O. (2002). Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. J Clin Endocrinol Metab 87, 316-321.
- Hussein, T.S., Thompson, J.G., and Gilchrist, R.B. (2006). Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. Dev Biol 296, 514-521.
- Isobe, N., Maeda, T., and Terada, T. (1998). Involvement of meiotic resumption in the disruption of gap junctions between cumulus cells attached to pig oocytes. J Reprod Fertil 113, 167-172.
- Jakobsson, P.J., Thoren, S., Morgenstern, R., and Samuelsson, B. (1999). Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 7220-7225.
- Jeremy, J.Y., Okonofua, F.E., Thomas, M., Wojdyla, J., Smith, W., Craft, I.L., and Dandona, P. (1987). Oocyte maturity and human follicular fluid prostanoids, gonadotropins, and prolactin after administration of clomiphene and pergonal. J Clin Endocrinol Metab 65, 402-406.
- Jesam, C., Salvatierra, A.M., Schwartz, J.L., and Croxatto, H.B. (2010). Suppression of follicular rupture with meloxicam, a cyclooxygenase-2 inhibitor: potential for emergency contraception. Hum Reprod 25, 368-373.

- Joyce, I.M., Pendola, F.L., O'Brien, M., and Eppig, J.J. (2001). Regulation of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 messenger ribonucleic acid expression in mouse granulosa cells during ovulation. Endocrinology 142, 3187-3197.
- Juengel, J.L., Hudson, N.L., Heath, D.A., Smith, P., Reader, K.L., Lawrence, S.B., O'Connell, A.R., Laitinen, M.P., Cranfield, M., Groome, N.P., et al. (2002). Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. Biol Reprod 67, 1777-1789.
- Kamel, R.M. (2010). Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. Reprod Biol Endocrinol 8, 21.
- Kanai, N., Lu, R., Satriano, J.A., Bao, Y., Wolkoff, A.W., and Schuster, V.L. (1995). Identification and characterization of a prostaglandin transporter. Science 268, 866-869.
- Karydis, S., Asimakopoulos, B., Papadopoulos, N., Vakalopoulos, I., Al-Hasani, S., and Nikolettos, N. (2005). ICSI outcome is not associated with the incidence of spermatozoa with abnormal chromatin condensation. In Vivo 19, 921-925.
- Katsuyama, M., Ikegami, R., Karahashi, H., Amano, F., Sugimoto, Y., and Ichikawa, A. (1998). Characterization of the LPS-stimulated expression of EP2 and EP4 prostaglandin E receptors in mouse macrophage-like cell line, J774.1. Biochem Biophys Res Commun 251, 727-731.
- Katsuyama, M., Sugimoto, Y., Morimoto, K., Hasumoto, K., Fukumoto, M., Negishi, M., and Ichikawa, A. (1997). 'Distinct cellular localization' of the messenger ribonucleic acid for prostaglandin E receptor subtypes in the mouse uterus during pseudopregnancy. Endocrinology 138, 344-350.
- Kennedy, C.R., Zhang, Y., Brandon, S., Guan, Y., Coffee, K., Funk, C.D., Magnuson, M.A., Oates, J.A., Breyer, M.D., and Breyer, R.M. (1999). Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. Nat Med 5, 217-220.
- Knight, P., and Glister, C. (2001). Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary Reproduction 121, 503-512.
- Kobayashi, T., Oda, T., Yoshimura, Y., Takehara, Y., Natori, M., and Nozawa, S. (1991). Androstenedione and progesterone concentrations in preovulatory follicular fluid correlate with successful fertilization and cleavage of human oocytes in vitro. Fertil Steril 56, 301-305.
- Kovanci, E., Rohozinski, J., Simpson, J.L., Heard, M.J., Bishop, C.E., and Carson, S.A. (2007). Growth differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure. Fertil Steril 87, 143-146.
- Kupker, W., Schulze, W., and Diedrich, K. (1998). Ultrastructure of gametes and intracytoplasmic sperm injection: the significance of sperm morphology. Hum Reprod 13 Suppl 1, 99-106.
- Laissue, P., Christin-Maitre, S., Touraine, P., Kuttenn, F., Ritvos, O., Aittomaki, K., Bourcigaux, N., Jacquesson, L., Bouchard, P., Frydman, R., et al. (2006). Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. Eur J Endocrinol 154, 739-744.
- Langenbach, R., Morham, S.G., Tiano, H.F., Loftin, C.D., Ghanayem, B.I., Chulada, P.C., Mahler, J.F., Lee, C.A., Goulding, E.H., Kluckman, K.D., et al. (1995). Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. Cell 83, 483-492.
- Lau, I.F., Saksena, S.K., and Chang, M.C. (1974). Prostaglandins F and ovulation in mice. J Reprod Fertil 40, 467-469.

- Li, Q., Jimenez-Krassel, F., Kobayashi, Y., Ireland, J.J., and Smith, G.W. (2006). Effect of intrafollicular indomethacin injection on gonadotropin surge-induced expression of select extracellular matrix degrading enzymes and their inhibitors in bovine preovulatory follicles. Reproduction 131, 533-543.
- Lim, H., and Dey, S.K. (1997). Prostaglandin E2 receptor subtype EP2 gene expression in the mouse uterus coincides with differentiation of the luminal epithelium for implantation. Endocrinology 138, 4599-4606.
- Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., Trzaskos, J.M., and Dey, S.K. (1997). Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. Cell 91, 197-208.
- Lu, R., Kanai, N., Bao, Y., and Schuster, V.L. (1996). Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA(hPGT). J Clin Invest 98, 1142-1149.
- Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Conneely, O.M., and O'Malley, B.W. (1996). Reproductive phenotpes of the progesterone receptor null mutant mouse. J Steroid Biochem Mol Biol 56, 67-77.
- Martin-Venegas, R., Roig-Perez, S., Ferrer, R., and Moreno, J.J. (2006). Arachidonic acid cascade and epithelial barrier function during Caco-2 cell differentiation. J Lipid Res 47, 1416-1423.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem 67, 753-791.
- Matzuk, M.M., Burns, K.H., Viveiros, M.M., and Eppig, J.J. (2002). Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. Science 296, 2178-2180.
- Mazerbourg, S., and Hsueh, A.J. (2003). Growth differentiation factor-9 signaling in the ovary. Mol Cell Endocrinol 202, 31-36.
- McGee, E.A., and Hsueh, A.J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr Rev 21, 200-214.
- McGrath, S.A., Esquela, A.F., and Lee, S.J. (1995). Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. Mol Endocrinol 9, 131-136.
- McKenzie, L.J., Pangas, S.A., Carson, S.A., Kovanci, E., Cisneros, P., Buster, J.E., Amato, P., and Matzuk, M.M. (2004). Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. Hum Reprod 19, 2869-2874.
- Mehlmann, L.M. (2005). Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. Reproduction 130, 791-799.
- Mendoza, C., Cremades, N., Ruiz-Requena, E., Martinez, F., Ortega, E., Bernabeu, S., and Tesarik, J. (1999). Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. Hum Reprod 14, 628-635.
- Mendoza, C., Ruiz-Requena, E., Ortega, E., Cremades, N., Martinez, F., Bernabeu, R., Greco, E., and Tesarik, J. (2002). Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. Hum Reprod 17, 1017-1022.
- Monniaux, D., Caraty, A., Clement, F., Dalbies-Tran, R., Dupont, J., Fabre, S., Gerard, N., Mermillod, P., Monget, P., and Uzbekova, S. (2009). Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. Inra Prod Anim 22, 59-76.

- Montgomery, G.W., Zhao, Z.Z., Marsh, A.J., Mayne, R., Treloar, S.A., James, M., Martin, N.G., Boomsma, D.I., and Duffy, D.L. (2004). A deletion mutation in GDF9 in sisters with spontaneous DZ twins. Twin Res 7, 548-555.
- Murakami, M., and Kudo, I. (2004). Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. Prog Lipid Res 43, 3-35.
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh, S., et al. (2000). Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. J Biol Chem 275, 32783-32792.
- Murdoch, W.J., Hansen, T.R., and McPherson, L.A. (1993). A review--role of eicosanoids in vertebrate ovulation. Prostaglandins 46, 85-115.
- Nagy, Z.P., Liu, J., Joris, H., Bocken, G., Desmet, B., Van Ranst, H., Vankelecom, A., Devroey, P., and Van Steirteghem, A.C. (1995a). The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates. Hum Reprod 10, 3171-3177.
- Nagy, Z.P., Liu, J., Joris, H., Verheyen, G., Tournaye, H., Camus, M., Derde, M.C., Devroey, P., and Van Steirteghem, A.C. (1995b). The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. Hum Reprod 10, 1123-1129.
- Narko, K., Ritvos, O., and Ristimaki, A. (1997). Induction of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F2alpha receptor expression by interleukin-1beta in cultured human granulosa-luteal cells. Endocrinology 138, 3638-3644.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. Physiol Rev 79, 1193-1226.
- Nastri, C.O., Ferriani, R.A., Rocha, I.A., and Martins, W.P. (2010). Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology and prevention. J Assist Reprod Genet 27, 121-128.
- Nicolaou, A., Masoodi, M., and Mir, A. (2009). Lipidomic analysis of prostanoids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Methods Mol Biol 579, 271-286.
- Nishimori, K., and Matzuk, M.M. (1996). Transgenic mice in the analysis of reproductive development and function. Rev Reprod 1, 203-212.
- Norman, R.J. (2001). Reproductive consequences of COX-2 inhibition. Lancet 358, 1287-1288.
- Norman, R.J., and Wu, R. (2004). The potential danger of COX-2 inhibitors. Fertil Steril 81, 493-494.
- Okazaki, T., Nishibori, M., Yamashita, Y., and Shimada, M. (2003). LH reduces proliferative activity of cumulus cells and accelerates GVBD of porcine oocytes. Mol Cell Endocrinol 209, 43-50.
- Orisaka, M., Orisaka, S., Jiang, J.Y., Craig, J., Wang, Y., Kotsuji, F., and Tsang, B.K. (2006). Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. Mol Endocrinol 20, 2456-2468.
- Otsuka, F., McTavish, K.J., and Shimasaki, S. (2011). Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. Mol Reprod Dev 78, 9-21.
- Otsuka, F., Moore, R.K., Wang, X., Sharma, S., Miyoshi, T., and Shimasaki, S. (2005). Essential role of the oocyte in estrogen amplification of follicle-stimulating hormone signaling in granulosa cells. Endocrinology 146, 3362-3367.

- Pall, M., Friden, B.E., and Brannstrom, M. (2001). Induction of delayed follicular rupture in the human by the selective COX-2 inhibitor rofecoxib: a randomized double-blind study. Hum Reprod 16, 1323-1328.
- Palmer, J.S., Zhao, Z.Z., Hoekstra, C., Hayward, N.K., Webb, P.M., Whiteman, D.C., Martin, N.G., Boomsma, D.I., Duffy, D.L., and Montgomery, G.W. (2006). Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. J Clin Endocrinol Metab 91, 4713-4716.
- Park, J.Y., Pillinger, M.H., and Abramson, S.B. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. Clin Immunol 119, 229-240.
- Patrizio, P., Fragouli, E., Bianchi, V., Borini, A., and Wells, D. (2007). Molecular methods for selection of the ideal oocyte. Reprod Biomed Online 15, 346-353.
- Peters, M.W., Pursley, J.R., and Smith, G.W. (2004). Inhibition of intrafollicular PGE2 synthesis and ovulation following ultrasound-mediated intrafollicular injection of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 in cattle. J Anim Sci 82, 1656-1662.
- Quintana, R., Kopcow, L., Marconi, G., Young, E., Yovanovich, C., and Paz, D.A. (2008). Inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) by meloxicam decreases the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model. Fertil Steril 90, 1511-1516.
- Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., van der Heijden, I., Kuil, A., de Haas, M., Wijnholds, J., and Borst, P. (2003). The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 9244-9249.
- Revelli, A., Delle Piane, L., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., and Rinaudo, P. (2009). Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. Reprod Biol Endocrinol 7, 40.
- Richards, J.S., and Hedin, L. (1988). Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. Annu Rev Physiol 50, 441-463.
- Rodgers, R.J., and Irving-Rodgers, H.F. (2010). Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. Biol Reprod 82, 1021-1029.
- Rodriguez-Lagunas, M.J., Martin-Venegas, R., Moreno, J.J., and Ferrer, R. (2010). PGE2 promotes Ca2+-mediated epithelial barrier disruption through EP1 and EP4 receptors in Caco-2 cell monolayers. Am J Physiol Cell Physiol 299, C324-334.
- Rosen, M.P., Zamah, A.M., Shen, S., Dobson, A.T., McCulloch, C.E., Rinaudo, P.F., Lamb, J.D., and Cedars, M.I. (2009). The effect of follicular fluid hormones on oocyte recovery after ovarian stimulation: FSH level predicts oocyte recovery. Reprod Biol Endocrinol 7, 35.
- Russell, D.L., and Robker, R.L. (2007). Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. Hum Reprod Update 13, 289-312.
- Saito, H., Kaneko, T., Takahashi, T., Kawachiya, S., Saito, T., and Hiroi, M. (2000). Hyaluronan in follicular fluids and fertilization of oocytes. Fertil Steril 74, 1148-1152.
- Schoenfelder, M., and Einspanier, R. (2003). Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. Biol Reprod 69, 269-277.
- Schuster, V.L. (2002). Prostaglandin transport. Prostaglandins Other Lipid Mediat 68-69, 633-647.
- Serhan, C.N., and Levy, B. (2003). Success of prostaglandin E2 in structure-function is a challenge for structure-based therapeutics. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 8609-8611.

- Shimada, M., and Terada, T. (2002a). FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. Mol Hum Reprod 8, 612-618.
- Shimada, M., and Terada, T. (2002b). Roles of cAMP in regulation of both MAP kinase and p34 (cdc2) kinase activity during meiotic progression, especially beyond the MI stage. Mol Reprod Dev 62, 124-131.
- Simon, A.M., Goodenough, D.A., Li, E., and Paul, D.L. (1997). Female infertility in mice lacking connexin 37. Nature 385, 525-529.
- Sirois, J. (1994). Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. Endocrinology 135, 841-848.
- Sirois, J., and Dore, M. (1997). The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. Endocrinology 138, 4427-4434.
- Sirois, J., Sayasith, K., Brown, K.A., Stock, A.E., Bouchard, N., and Dore, M. (2004). Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. Hum Reprod Update 10, 373-385.
- Sirois, J., Simmons, D.L., and Richards, J.S. (1992). Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. Induction in vivo and in vitro. J Biol Chem 267, 11586-11592.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annu Rev Biochem 69, 145-182.
- Smitz, J., Andersen, A.N., Devroey, P., and Arce, J.C. (2007). Endocrine profile in serum and follicular fluid differs after ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH in IVF patients. Hum Reprod 22, 676-687.
- Su, Y.Q., Sugiura, K., and Eppig, J.J. (2009). Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. Semin Reprod Med 27, 32-42.
- Su, Y.Q., Sugiura, K., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J., Affourtit, J.P., Pangas, S.A., Matzuk, M.M., and Eppig, J.J. (2008). Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. Development 135, 111-121.
- Su, Y.Q., Wu, X., O'Brien, M.J., Pendola, F.L., Denegre, J.N., Matzuk, M.M., and Eppig, J.J. (2004). Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. Dev Biol 276, 64-73.
- Sugimoto, Y., Namba, T., Honda, A., Hayashi, Y., Negishi, M., Ichikawa, A., and Narumiya, S. (1992). Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. J Biol Chem 267, 6463-6466.
- Sugiura, K., and Eppig, J.J. (2005). Society for Reproductive Biology Founders' Lecture 2005. Control of metabolic cooperativity between oocytes and their companion granulosa cells by mouse oocytes. Reprod Fertil Dev 17, 667-674.
- Takahashi, C., Fujito, A., Kazuka, M., Sugiyama, R., Ito, H., and Isaka, K. (2008). Anti-Mullerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. Fertil Steril 89, 586-591.

- Takahashi, T., Morrow, J.D., Wang, H., and Dey, S.K. (2006). Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E(2) directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. J Biol Chem 281, 37117-37129.
- Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M., and Kudo, I. (2000). Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. J Biol Chem 275, 32775-32782.
- Thonneau, P., Marchand, S., Tallec, A., Ferial, M.L., Ducot, B., Lansac, J., Lopes, P., Tabaste, J.M., and Spira, A. (1991). Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). Hum Reprod 6, 811-816.
- Tokuyama, O., Nakamura, Y., Musoh, A., Honda, K., Ozaki, K., and Ishiko, O. (2003). Expression and distribution of cyclooxygenase-2 in human ovary during follicular development. Osaka City Med J 49, 39-47.
- Tsafriri, A., Koch, Y., and Lindner, H.R. (1973). Ovulation rate and serum LH levels in rats treated with indomethacin or prostaglandin E2. Prostaglandins 3, 461-467.
- Varnagy, A., Bodis, J., Manfai, Z., Wilhelm, F., Busznyak, C., and Koppan, M. (2010). Low-dose aspirin therapy to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. Fertil Steril 93, 2281-2284.
- Vitt, U.A., Hayashi, M., Klein, C., and Hsueh, A.J. (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. Biol Reprod 62, 370-377.
- Vitt, U.A., Mazerbourg, S., Klein, C., and Hsueh, A.J. (2002). Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. Biol Reprod 67, 473-480.
- von Euler, U.S. (1936). On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). J Physiol 88, 213-234.
- Watabe, A., Sugimoto, Y., Honda, A., Irie, A., Namba, T., Negishi, M., Ito, S., Narumiya, S., and Ichikawa, A. (1993). Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. J Biol Chem 268, 20175-20178.
- Webb, R., Campbell, B.K., Garverick, H.A., Gong, J.G., Gutierrez, C.G., and Armstrong, D.G. (1999). Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. J Reprod Fertil Suppl 54, 33-48.
- Wu, Y.T., Tang, L., Cai, J., Lu, X.E., Xu, J., Zhu, X.M., Luo, Q., and Huang, H.F. (2007). High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. Hum Reprod 22, 1526-1531.
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F.J., Elvin, J.A., Carino, C., Prasad, S.V., Skinner, S.S., Dunbar, B.S., Dube, J.L., et al. (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. Mol Endocrinol 15, 854-866.
- Yeo, C.X., Gilchrist, R.B., Thompson, J.G., and Lane, M. (2008). Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. Hum Reprod 23, 67-73.
- Zhao, H., Qin, Y., Kovanci, E., Simpson, J.L., Chen, Z.J., and Rajkovic, A. (2007). Analyses of GDF9 mutation in 100 Chinese women with premature ovarian failure. Fertil Steril 88, 1474-1476.

ANNEXE

Patientes	Liquides folliculaires	PGE2 (pg/mL)	Médianes PGE2 (pg/mL)	Moyennes PGE2 (pg/mL)	Progestérone (ng/mL)	Médianes Progestérone (ng/mL)	Moyennes Progestérone (ng/mL)
A	LF1	282,4	194,2	200,4	9350	10545	11075
	LF2	124,7			13330		
	LF3	194,2			10545		
B	LF1	1858,1	6956,4	6386,5	19030	19030	21040
	LF2	10345,0			25380		
	LF3	6956,4			18710		
C	LF1	939,6	939,6	832,5	6200	12120	10817
	LF2	267,0			14130		
	LF3	1291,0			12120		
D	LF1	486,2	486,2	874,2	12400	12400	14617
	LF2	434,9			22400		
	LF3	1701,6			9050		
E	LF1	227,6	227,6	273,4	22660	16310	16170
	LF2	176,9			16310		
	LF3	415,8			9540		
F	LF1	301,0	352,9	356,7	11570	11570	9450
	LF2	352,9			4280		
	LF3	416,1			12500		
G	LF1	325,4	389,3	389,3	9780	14680	13210
	LF2	ND			14680		
	LF3	453,1			15170		
H	LF1	199,7	142,0	153,5	13930	13930	13727
	LF2	142,0			13320		
	LF3	118,9			13930		
I	LF1	419,3	392,8	356,4	17530	13730	13157
	LF2	392,8			13730		
	LF3	257,3			8210		
J	LF1	139,5	129,9	123,5	12740	12740	12460
	LF2	101,3			10730		
	LF3	129,9			13910		
K	LF1	174,3	178,9	231,1	2190	4570	5557
	LF2	178,9			9910		
	LF3	339,9			4570		

L	LF1	825,4	968,2	977,4	19620	12520	12503
	LF2	968,2			5370		
	LF3	1138,6			12520		
M	LF1	890,8	1764,3	1546,0	25440	22910	20217
	LF2	1764,3			12300		
	LF3	1982,9			22910		
N	LF1	42,6	70,2	108,0	10710	16660	15357
	LF2	211,1			18700		
	LF3	70,2			16660		
O	LF1	857,5	493,1	504,4	14370	14370	13830
	LF2	493,1			15050		
	LF3	162,7			12070		
P	LF1	305,7	398,3	371,7	14130	19710	21480
	LF2	411,2			30600		
	LF3	398,3			19710		
Q	LF1	481,3	414,8	408,3	17910	12780	13553
	LF2	328,7			9970		
	LF3	414,8			12780		
R	LF1	413,5	308,8	333,3	15000	13010	12683
	LF2	277,6			13010		
	LF3	308,8			10040		

NOM : QUIGNARD-LOPES PRENOM : MURIEL

TITRE : EVALUATION DE LA PROSTAGLANDINE E2 FOLLICULAIRE COMME MARQUEUR DE QUALITE OVOCYTAIRE AU COURS DE TENTATIVES DE FECONDATION IN VITRO

RESUME :

La Prostaglandine E2 et la progestérone sont deux médiateurs paracrines essentiels, sécrétés dans le liquide folliculaire en période pré-ovulatoire, et impliqués dans des processus permettant aux ovocytes d'acquérir la capacité d'être fécondés, d'évoluer en embryon et d'aboutir à une grossesse viable.

L'objectif de ce travail a été de déterminer si ces marqueurs présentaient un intérêt prédictif en terme de qualité ovocytaire dans les liquides folliculaires recueillis au cours de procédures d'ICSI réalisées chez 18 couples suivis dans le service de Biologie et Médecine de la Reproduction du CHU de Nantes.

Dans cette étude, les concentrations folliculaires de PGE2 sont plus faibles dans les follicules contenant des ovocytes qui étaient aptes à être fécondés par rapport à ceux qui ne l'étaient pas. La progestérone ne semble pas être un marqueur folliculaire de qualité ovocytaire.

Il semble que la cinétique de production de PGE2 soit un facteur-clé dans la régulation de la qualité ovocytaire en période pré-ovulatoire. Ce travail, de par son design novateur et les résultats obtenus, représente un outil supplémentaire dans la compréhension des mécanismes de régulation de la maturation ovocytaire pré-ovulatoire.

MOTS-CLES :

Prostaglandine E2

Progestérone

Liquide folliculaire

Qualité ovocytaire

ICSI