

# **Introduction**

## **A – Assistance médicale à la procréation (AMP)**

### **1) Epidémiologie de la fertilité:**

L'infertilité est définie comme l'incapacité, pour un homme, une femme ou un couple d'obtenir une naissance (vivante) désirée. L'infertilité est donc un état existant indépendamment des tentatives effectuées par le couple pour mener une grossesse à terme. Pour cette raison, la définition médicale la plus fréquente de l'infertilité est le fait de n'avoir pas obtenu de conception après 12 ou 24 mois de tentatives bien menées, c'est-à-dire avec des rapports réguliers en l'absence de contraception.

Les possibilités pour mesurer la prévalence de l'infertilité d'une population sont :

- De demander aux couples leur délai nécessaire à concevoir (DNC) lors d'une grossesse; et en déduire la fécondabilité, définie comme la probabilité mensuelle de conception (inverse du DNC).
- De considérer comme infertiles les couples rapportant au cours d'une enquête que, pendant une certaine durée précédant l'enquête, ils ont été exposés au risque de conception sans qu'il y ait eu de grossesse.
- D'estimer le nombre de couples consultant pour infertilité ou ayant recours à des traitements contre l'infertilité.

Il reste difficile de donner des estimations de l'infertilité dans une population. Tout d'abord, car les couples peuvent rarement se savoir infertiles sans avoir recherché une grossesse. Ensuite, parce que les couples sont peu informés sur le fait que, même avec une fertilité normale, il faut plusieurs mois pour obtenir une conception : le sentiment d'échec dépend donc fortement du degré d'impatience des couples.

Quand on utilise l'indicateur le plus pertinent, c'est-à-dire la proportion des couples restants sans grossesse après un an d'exposition, on estime l'infertilité à 15-20% des couples (Spira, 2012).

Parmi les étiologies d'infertilité, on retrouve un facteur masculin prédominant dans 20% des cas, un facteur féminin dans 33% des cas, un facteur mixte dans 39% des cas tandis que les étiologies idiopathiques représentent 8% des cas (Thonneau, 1991).

### **2) Résultats actuels en AMP**

Selon l'INSEE, 819 191 enfants sont nés en France au cours de l'année 2012. Les enfants conçus après une AMP réalisée en 2012 sont au nombre de 23 887 et représentent donc 2,9% des enfants nés de la population générale cette année-là. Un enfant sur 35 est donc issu d'AMP en 2012. En incluant les stimulations hormonales sans FIV, on peut estimer qu'au minimum 5% des couples ayant obtenu une naissance vivante avaient donc été traités médicalement (Spira, 2012).

D'après les données de l'Agence de la biomédecine, en 2012, on recense 142 708 tentatives regroupant différents types d'AMP : inséminations, fécondations in vitro et transferts d'embryons congelés (tableau I).

Tableau I : Evolution de l'activité globale d'AMP  
entre 2009 et 2012 (données : agence de la biomédecine).

	2009	2010	2011	2012
<b>Nombre de centres</b>				
Nombre de laboratoires d'AMP [nombre de laboratoires n'ayant pas transmis leur rapport]	94 [3]	95 [1]	92 [0]	96 [0]
Nombre de centres clinico-biologiques**	107	104	104	103
<b>Nombre d'inséminations artificielles totales</b>	<b>57301</b>	<b>60224</b>	<b>59001</b>	<b>58478</b>
Inséminations intra-utérines intraconjugales	52861	55728	54772	54390
Inséminations intra-utérines avec sperme de donneur	3890	4043	4004	3870
Inséminations intra-cervicales	550	453	225	218
<b>Nombre de tentatives réalisées en fécondation in vitro total (FIV hors ICSI, ICSI, TEC) total</b>	<b>74435</b>	<b>79717</b>	<b>82296</b>	<b>84230</b>
Selon l'origine des gamètes et des embryons (quelle que soit la technique de FIV)				
Intraconjugal	71948	77190	79567	81370
Don de spermatozoïdes	1459	1445	1529	1640
Accueil d'embryons	95	114	83	136
Don d'ovocytes	933	968	1117	1084
Selon les techniques (quelle que soit l'origine des gamètes et des embryons)				
FIV hors ICSI	21320	22171	21929	21481
ICSI	35553	37930	39816	40610
TEC	17562	19616	20551	22139
<b>Nombre total de tentatives*</b>	<b>131736</b>	<b>139941</b>	<b>141297</b>	<b>142708</b>

\*Tentatives : cycles d'insémination artificielle (IIU, IIC) + ponctions d'ovocytes dans le cadre des fécondations in vitro (FIV, ICSI) + transferts d'embryons congelés (TEC)  
\*\*Tous les centres clinico-biologiques transmettent leur rapport depuis 2008

Concernant la fécondation in vitro (FIV), une des évolutions les plus marquantes est la réduction du nombre moyen d'embryons transférés. Sur les 4 dernières années, on constate une augmentation sensible des transferts mono embryonnaires : de 32% en 2009 à 40% en 2012 (Agence de la biomédecine, 2012). Cette évolution est le reflet d'une politique de transfert embryonnaire prudente visant à réduire le nombre de grossesses multiples et prévenir ainsi leurs complications materno-fœtales.

La politique de transferts mono embryonnaires est d'autant plus facile à mettre en place que les protocoles de congélation embryonnaire se sont améliorés au cours des dernières années. Les taux de survie à la décongélation sont satisfaisants (Loutradi, 2008 ; Kolibianakis, 2009 ; AbdelHafez, 2010 ; Debrock, 2015). En outre, les taux d'implantation d'embryons congelés sont équivalents à ceux obtenus avec des embryons frais (Edgar, 2012), n'occasionnant pas de perte de chance pour les couples. Après transfert d'embryons congelés, les taux de grossesse échographique par transfert et d'accouchement par transfert sont respectivement de 19 à 25%, et de 15 à 19%. Ainsi, des chances de succès supplémentaires sont offertes aux couples pour qui il a été possible de congeler des embryons après la fécondation in vitro et qui pourront bénéficier d'un ou de plusieurs transferts embryonnaires ultérieurs.

Selon le bilan clinique et paraclinique des deux membres du couple, la prise en charge en AMP repose sur plusieurs techniques. Les enfants nés en France après AMP sont issus de différentes techniques d'AMP, de différentes origines gamétiques et embryonnaires (figure 1) : IIU (insémination intra-utérine), FIV (fécondation in vitro) classique, ICSI (Intracytoplasmic sperm injection), TEC (transfert d'embryons congelés), IMSI (intracytoplasmic morphologically-selected sperm injection), don de gamètes ou d'embryons, DPI (diagnostic pré-implantatoire), DPC (diagnostic pré-conceptionnel), MIV (maturation in vitro), etc.

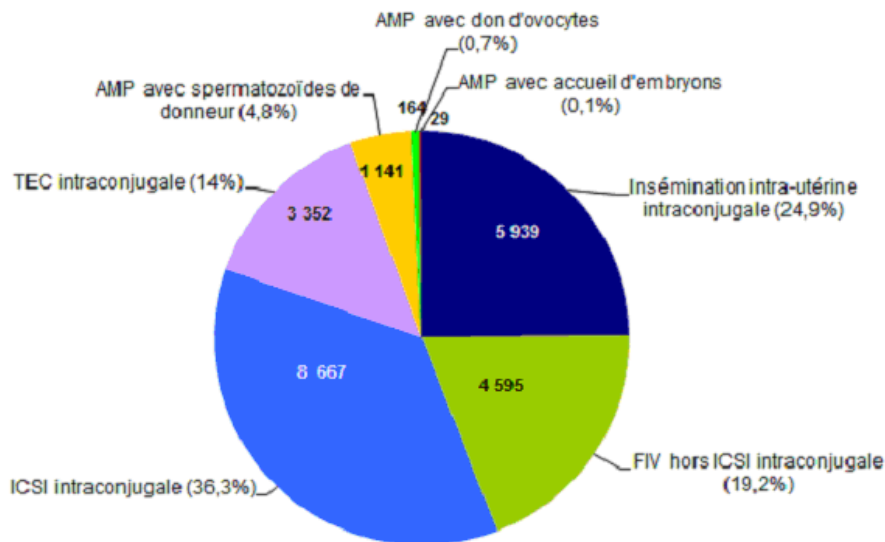


Figure 1 : Part des enfants nés après AMP en 2012 selon le type d'AMP et l'origine des gamètes (données : agence de la biomédecine).

Néanmoins, malgré les progrès de ces techniques, les taux de succès en FIV restent relativement faibles : les taux de grossesse échographique et d'accouchement par ponction sont respectivement de 23,8 et de 19,6% (Agence de la biomédecine, 2012). On retrouve ces résultats quelque soit les pays. Ainsi, même aux Etats-Unis, pays ayant les meilleurs taux de succès en AMP (Ishihara, 2015), sur les 165 172 cycles de l'année 2012, seulement 40.6% des cycles de FIV intraconjugaux chez des femmes de moins de 35 ans ont donné une naissance vivante (Sunderam, 2015).

### **3) Pistes d'amélioration**

Le choix de l'embryon à transférer a une importance cruciale puisqu'il doit permettre de sélectionner l'embryon ayant le plus fort potentiel implantatoire, avec comme objectif l'augmentation des probabilités de grossesse et la limitation des risques de grossesse multiple. A l'heure actuelle, ce choix est basé sur la morphologie et la cinétique embryonnaires. Pour ce faire, la majorité des embryologistes utilisent les travaux d'une réunion d'experts de la société européenne de reproduction humaine et d'embryologie (ESHRE) sur la classification embryonnaire (Balaban, 2011).

Les embryons sont observés à différents temps-clé. La décision de transfert est basée sur des paramètres morphocinétiques du développement embryonnaire comme : le stade développemental, la régularité embryonnaire, le taux de fragmentation, la présence ou non d'un clivage précoce, de blastomères multinuclés, etc. Certains auteurs ont en effet démontré que la morphologie embryonnaire est clairement corrélée à la viabilité de l'embryon (Meseguer, 2012).

Cependant, malgré l'amélioration des critères de sélection, les taux de grossesse obtenus par transfert sont relativement faibles ; ceci montre les limites de la morphologie embryonnaire dans le choix de l'embryon à transférer (Bromer, 2008).

De même, moins de 7% des ovocytes recueillis en FIV se développent en embryons normaux donnant une naissance vivante (Patrizio, 2009). La morphologie ovocytaire peut être évaluée par certains critères de mauvais pronostic comme les vacuoles d'endocytose, l'amas de SER, le bull's eye, une zone pellucide épaisse ou hérissée, un espace péivitellin élargi ou

granuleux, un globule polaire polylobé ou fragmenté ... mais ceux-ci se révèlent également imparfaits.

Il devient donc essentiel de développer de nouvelles méthodes permettant de choisir l'embryon offrant la plus grande probabilité de grossesse. Plusieurs outils ont été développés récemment avec pour objectif de définir des marqueurs prédictifs de la compétence ovocytaire ou du développement embryonnaire et qui soient : reproductibles, faciles à mettre en œuvre, rapides à obtenir (délai de réponse compatible avec le délai du transfert embryonnaire), de faible coût et indépendants des autres critères morphologiques.

#### **a- Système time lapse monitoring (TLM)**

Les observations répétées apportent une meilleure compréhension du développement de l'embryon. Cependant, chaque observation implique une manipulation à l'extérieur de l'incubateur avec exposition des embryons à des conditions environnementales non optimales. Or, les conditions de culture sont essentielles pour obtenir des résultats satisfaisants en termes de développement embryonnaire, de taux d'implantation et de taux de grossesse (de Mouzon, 2010 ; Nygren, 2012). Ainsi, les variations de température et de pH provoquées par les ouvertures de l'incubateur pourraient avoir un effet nocif sur le développement embryonnaire. Le dilemme du biologiste est donc de trouver le bon équilibre entre la nécessité d'évaluer le développement embryonnaire et le besoin de limiter l'exposition de l'embryon à des conditions suboptimales.

Les systèmes time lapse monitoring (TLM) consistent à mettre en culture les embryons dans un incubateur muni d'une caméra photographiant les embryons à intervalles de temps réguliers et rapprochés. Contrairement à l'incubation classique, grâce aux systèmes TLM, les embryons peuvent rester dans un milieu adéquat tout au long de leur mise en culture. En outre, les photographies rapprochées permettent d'observer tous les stades du développement embryonnaire et notamment d'apprécier toutes les étapes clés (formation des pronuclei, clivage précoce, etc).

En 2012, pour la première fois, une étude rétrospective démontre un bénéfice du TLM en termes de taux de grossesses (Meseguer, 2012). Depuis, nombreux ont été ceux qui ont tenté, à l'aide de ce système, de définir de nouveaux paramètres morphocinétiques prédictifs du bon développement embryonnaire (Milewski, 2015 ; Siristatidis, 2015). Malgré tout, la supériorité du TLM par rapport à l'incubation classique reste controversée, notamment du fait d'un manque d'essai contrôlé randomisé prospectif (Kaser, 2014). Une méta-analyse récente conclut à l'absence de différence significative en termes de taux de naissance, de fausse couche ou de grossesse clinique entre le TLM et l'incubation embryonnaire conventionnelle (Cochrane, 2015).

#### **b- Omiques**

Malgré l'importance de l'analyse morpho-cinétique de l'embryon, celle-ci reste insuffisante pour approcher les mécanismes moléculaires présidant au développement de l'embryon pré-implantatoire. Le développement des techniques de biologie moléculaire et notamment des « omiques » a permis d'envisager l'étude à grande échelle de marqueurs de la viabilité embryonnaire.

L'objectif est d'identifier des biomarqueurs prédictifs de la qualité ovocytaire et embryonnaire (Dumesic, 2015). Pour mener des études non invasives, les marqueurs recherchés appartiennent à différents échantillons biologiques qui ne sont pas utilisés pour la suite de la procédure d'AMP tels que les cellules folliculeuses, le liquide folliculaire ou même le milieu de culture embryonnaire. Au sein de ces différents échantillons biologiques sont

développées des méthodes étudiant les évènements transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels.

### b1/ Transcriptomique

La transcriptomique est l'étude de l'ensemble des ARN messagers produits lors du processus de transcription du génome. La compréhension du transcriptome est donc essentielle pour interpréter les aspects fonctionnels du génome.

Cependant, la connaissance des transcrits d'embryons humains est limitée par l'accès restreint à la recherche sur l'embryon et par la quantité limitée de matériel génétique dans un embryon. Par conséquent, la plupart des études ont lieu sur des embryons surnuméraires. Ces embryons n'étant pas transférés, les résultats ne peuvent pas être corrélés avec la viabilité embryonnaire en terme de taux de grossesse. Ainsi, les résultats obtenus sont majoritairement ceux d'études animales, des résultats qui ne sont pas directement transposables chez l'humain. Malgré cela, plusieurs études retrouvent des profils d'expression génique différents entre des embryons s'implantant et des embryons ne s'implantant pas (El Sayed, 2006 ; Ghanem, 2011 ; Parks, 2011). Chez l'homme, une seule étude a permis d'identifier plus de 700 transcrits qui étaient uniquement exprimés chez des embryons humains donnant une grossesse, confirmant ainsi l'hypothèse que l'expression génique est un facteur prédictif de grossesse (Jones, 2008). Les progrès du séquençage nouvelle génération (NGS) et des puces d'hybridation génomique comparative (CGH-array) permettent de séquencer l'intégralité du transcriptome provenant de biopsies de trophoctoderme de blastocystes. Les résultats obtenus avec les deux techniques sont concordants (Fiorentino, 2014) et il existe des différences de transcrits entre les blastocystes donnant une naissance vivante et les blastocystes ne s'implantant pas malgré une classification morphologique identique (Kirkegaard, 2015).

Plusieurs auteurs étudient donc les transcrits des cellules folliculeuses car, contrairement à l'étude des embryons, il s'agit d'une méthode non invasive pouvant refléter les caractéristiques et la qualité ovocytaire et embryonnaire. L'étude du transcriptome des cellules folliculeuses est possible grâce à la qRT-PCR (quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction) et grâce aux technologies microarrays (Uyar, 2013). Il existe un lien entre du profil d'expression des cellules folliculeuses avec la maturité ovocytaire (Ouandaogo, 2011), avec le clivage précoce embryonnaire (van Montfoort, 2008), avec la qualité de l'embryon au troisième jour du développement (Assou, 2008) et avec le potentiel implantatoire (Hamel, 2008).

### b2/ Protéomique

La protéomique est une étude des protéines à large échelle. Le protéome dépend directement de l'état physiologique d'une cellule. L'étude du protéome va donc plus loin que la simple analyse des protéines et elle permet une meilleure compréhension des fonctions cellulaires que la transcriptomique dans la mesure où presque la moitié des ARNm produits ne sont pas traduits et/ou dégradés avant la synthèse protéique (Dumesic, 2015).

Des études analysant la protéomique permettent de connaître la composition du liquide folliculaire chez des femmes fertiles (Zamah, 2015) : à ce jour, 480 protéines ont été identifiées par spectrophotométrie de masse dans le liquide folliculaire (Ambekar, 2013). L'étude de la protéomique permet également de mieux comprendre la physiopathologie de certaines des étiologies féminines les plus courantes d'infertilité : le syndrome des ovaires polykystiques (Jarkovska, 2011 ; Ambekar, 2014), l'endométrieose (Lo Turco, 2013 ; Regiani, 2015). Une étude a même mis en place un modèle combinant les informations apportées par la protéomique et par le TLM afin d'améliorer la sélection embryonnaire (Dominguez, 2015).

### b3/ Métabolomique

La métabolomique étudie l'ensemble des métabolites d'un échantillon biologique. Comme dans le cas de la protéomique, ces résultats dépendent également de l'état physiologique des cellules.

La composition du microenvironnement folliculaire est directement influencée par la communication bidirectionnelle entre l'ovocyte et les cellules qui l'entourent. Ainsi, le liquide folliculaire est le reflet direct du développement ovocytaire (Dumesic, 2015), et, sa composition pourrait être un facteur prédictif du potentiel développemental ovocytaire et embryonnaire. En effet, le liquide folliculaire reflète l'ensemble du métabolisme du follicule et il contient des molécules qui sont essentielles pour la maturation ovocytaire.

La coordination entre croissance ovocytaire, prolifération des cellules de la granulosa et différenciation des cellules thécales est assurée par des protéines ovocytaires de la superfamille transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) dont le BMP 15 (bone morphogenetic protein 15) et le GDF 9 (growth differentiation factor 9). Ces protéines interagissent avec les cellules environnantes qui produisent à leur tour leurs propres facteurs paracrines (kit ligand, inhibines, activines, antimüllerian hormone (AMH), TGF $\alpha$  (Sugiura, 2005 ; Gosden, 2010 ; Li, 2013) (figure 2).

Plusieurs auteurs se sont penchés sur les concentrations dans le liquide folliculaire : de différentes hormones (Reinthaller, 1987 ; Basuray, 1988 ; Enien, 1995; Mantzoros, 2000; De Placido, 2006), de facteurs de croissance (Artini, 1994 ; Chang, 2002 ; Cupisti, 2007 ; Wu, 2007 ; Wang, 2006) et de dérivés réactifs de l'oxygène (Attaran, 2000 ; Pasqualotto, 2004). D'autres approches enfin consisteraient à identifier une signature moléculaire du liquide folliculaire ou du milieu de culture (Seli, 2010 ; Gardner, 2001 ; Katz-Jaffe, 2006).

Les corrélations entre ces concentrations et le taux de fécondation, ou de grossesse n'étaient pas toujours statistiquement significatives. Seule une étude démontre des différences de composition métabolique du liquide folliculaire chez les femmes dont l'hormone chorionique gonadotrope humaine ( $\beta$ -hCG) s'est positivée suite à la tentative d'AMP et celles dont la  $\beta$ -hCG est restée négative (Wallace, 2012).

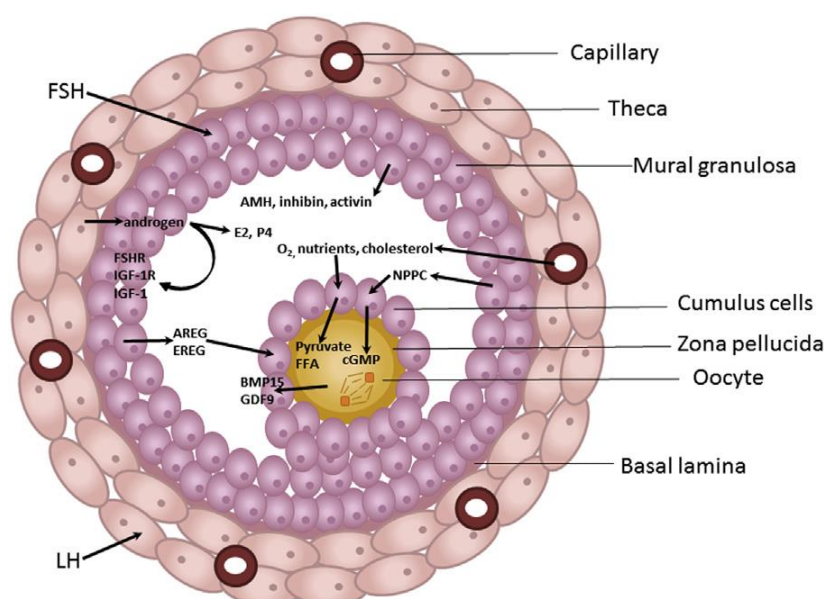


Figure 2 : Interaction bidirectionnelle entre l'ovocyte et les cellules environnantes (Li, 2013).



### **c- Cytokines et facteurs de croissance**

La qualité ovocytaire est également liée avec le taux de cytokines et de facteurs de croissance dans le liquide folliculaire : en effet, il existe une corrélation entre la qualité ovocytaire et des concentrations augmentées en G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) (Ledee, 2010; 2011; 2013), en interleukines (IL)-12, IL-6, IL-8 et IL-18 (Sarapik, 2012; Bedaiwy, 2007), en facteur neurotrophique dérivé du cerveau (Wu, 2012), en BMP2 (Sugiyama, 2010). La qualité ovocytaire est également corrélée avec des concentrations diminuées en IL-1, IL-12 (Mendoza, 2002) et en isoforme 165 du VEGF (Savchev, 2010).

Cependant, le facteur jouant le rôle le plus déterminant de la qualité ovocytaire n'a pas encore été défini (Dumesic, 2015).

## **B- Ovocyte et microenvironnement folliculaire**

### **1) Ovogenèse**

L'ovogenèse représente l'ensemble des processus permettant la multiplication, la croissance et la différenciation des cellules germinales femelles jusqu'au stade de l'ovocyte mature. Ces phénomènes sont sous la dépendance du dialogue existant entre l'ovocyte et les cellules folliculeuses. C'est un processus discontinu, se déroulant de la vie fœtale, jusqu'à la ménopause, et se déroulant selon la chronologie suivante (Thibault, 2001) (Figure 3) :

- **Multiplication** : Les ovogonies se multiplient par mitose pendant la vie fœtale, et entrent en méiose jusqu'au stade d'ovocyte I, bloquent en fin de prophase de première division (noyau sous forme de vésicule germinative). Les ovocytes I s'associent avec les cellules périovocytaires, pour former les follicules primordiaux.

- **Croissance** : Cette longue phase, débutant après la naissance et se terminant lors de la maturation finale du follicule, permet à l'ovocyte de passer d'une taille de 35-40 µm à une taille de 120 µm de diamètre. Le noyau, au stade de vésicule germinative, voit son diamètre doubler de taille. L'ovocyte est alors le siège de phénomènes de transcription et de synthèses protéiques intenses (ZP1, ZP2, ZP3 et protéines du cycle cellulaire) et de modifications cytoplasmiques (au niveau mitochondrial, de l'appareil de Golgi, des granules corticaux, et de la zone pellucide). Au fur et à mesure de sa croissance, l'ovocyte pourra alors acquérir sa compétence méiotique puis sa compétence au développement, se finalisant après le pic de LH. A la fin de la phase de croissance, la chromatine se réorganise au niveau périnucléolaire, et les activités de transcription s'estompent.

- **Maturation** : Elle comprend une maturation cytoplasmique, nucléaire et membranaire. La maturation cytoplasmique correspond à la capacité de l'ovocyte mature à subir une fécondation et à soutenir un développement embryonnaire normal, grâce à l'accumulation de transcrits maternels. Au cours de la croissance ovocytaire, l'acquisition de la compétence cytoplasmique reste difficilement appréciable, en dehors de l'évaluation du diamètre de l'ovocyte. Concernant la maturation nucléaire, chaque mois et ce, jusqu'à la ménopause, le pic préovulatoire de LH permettra à un ovocyte de reprendre sa méiose (métaphase I, anaphase I et télophase I). L'ovocyte expulse alors son premier globule polaire, sans subir d'interphase, puis débute sa deuxième division méiotique jusqu'au stade de métaphase II. Seul la fécondation lui permettra de terminer sa méiose (anaphase II et télophase II), et d'expulser son deuxième globule polaire.

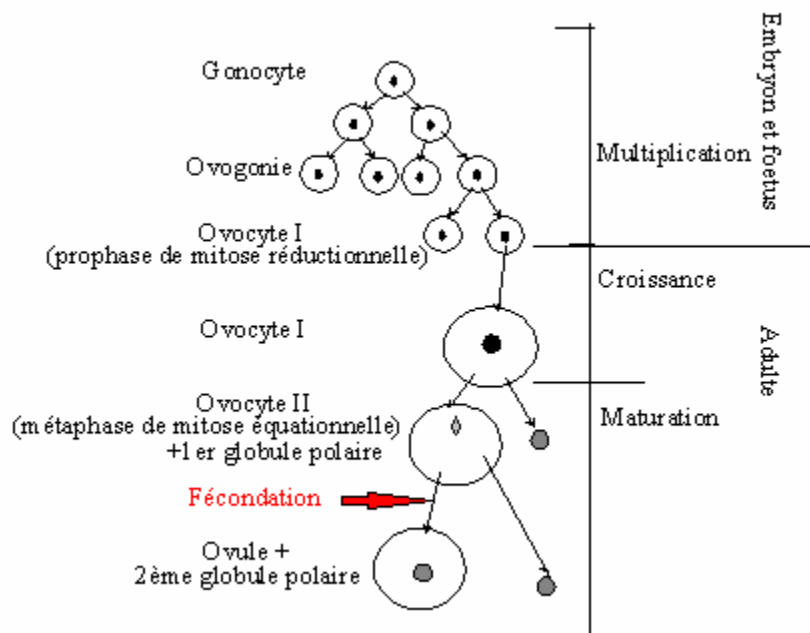


Figure 3 : Schéma général de l'ovogenèse (Parinaud, 2013).

Au niveau moléculaire, l'inhibition de la reprise de méiose au stade de prophase I est rendue possible grâce à des facteurs folliculaires comme l'OMI (Oocyte meiotic inhibitor), et grâce à des facteurs ovocytaires comme une concentration élevée en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). En revanche, la décharge ovulante de LH va bloquer la transmission du signal OMI, induire une synthèse de Stéroïdes Activateurs de Méiose (MAS) par les cellules du cumulus, une libération de calcium intracellulaire, et diminuer la concentration d'AMPc, permettant ainsi la reprise de la méiose. Celle-ci est également initiée par un facteur cytoplasmique, le MPF (M-Phase promoting factor), qui induit la phosphorylation de diverses cibles (histones 1, l'ARN polymérase, protéines associées aux microfilaments...). Ces phénomènes entraînent la rupture de la vésicule germinative (GVBD), la condensation des chromosomes, le remodelage du cytosquelette pour la mise en place du fuseau méiotique, ainsi que des modifications de la synthèse protéique. Le maintien de l'ovocyte en métaphase II est alors permis grâce au facteur cytotatique CSF, kinase inhibant la dégradation des cyclines et permettant le maintien d'un taux élevé de MPF.

## 2) Folliculogenèse

La folliculogenèse correspond à la succession des différentes étapes du développement folliculaire de la sortie de la réserve jusqu'à l'ovulation ou l'involution (Thibault, 2001). C'est un phénomène continu où l'ovaire a une activité propre et une régulation locale, alors que l'axe hypothalamo-hypophysaire ne régule, à partir de la puberté et de façon cyclique, que les étapes de la folliculogenèse terminale et de l'ovulation. L'évolution folliculaire la plus commune est l'atrésie (99.9%), puisque seulement 400 follicules iront jusqu'à l'ovulation sur un stock fœtal de 7 millions.

### a- Différents types histologiques de follicules

Au cours de son développement, un follicule passe par différents stades (Figure 4) :

- Follicule primordial : Un follicule primordial est constitué d'un ovocyte bloqué en fin de prophase I, et d'une couche de cellules folliculeuses endothéliformes aplaties. Les



follicules primordiaux représentent plus de 95 % de la population folliculaire totale de l'ovaire, constituant la "réserve ovarienne".

- Follicule primaire : Un follicule primaire est constitué d'un ovocyte bloqué en fin de prophase I, et d'une couche de cellules folliculeuses cubiques. La membrane de Slavjanski devient visible, ainsi que le premier signe de formation de la zone pellucide.
- Follicule secondaire : Ce follicule est composé d'un ovocyte bloqué en fin de prophase I, et de plusieurs couches de cellules folliculeuses cubiques, constituant la granulosa.
- Follicule préantral : Ce follicule présente un nombre supérieur de couches de cellules de la granulosa, tandis que les cellules du stroma s'organisent en thèques interne et externe. C'est à ce stade que le follicule devient sensible aux gonadotrophines.
- Follicule tertiaire ou cavitaire ou « à antrum » : A ce stade apparaît une cavité riche en liquide folliculaire, l'antrum. Les cellules folliculeuses s'organisent en cumulus oophorus au niveau duquel fait saillie l'ovocyte (la couche cellulaire interne prenant le nom de corona radiata), et en granulosa murale pour celles regroupées le long de la paroi folliculaire. La thèque interne, très vascularisée, est formée de cellules chargées d'aromatiser les androgènes en estrogènes, tandis que la thèque externe est constituée de cellules stromales.

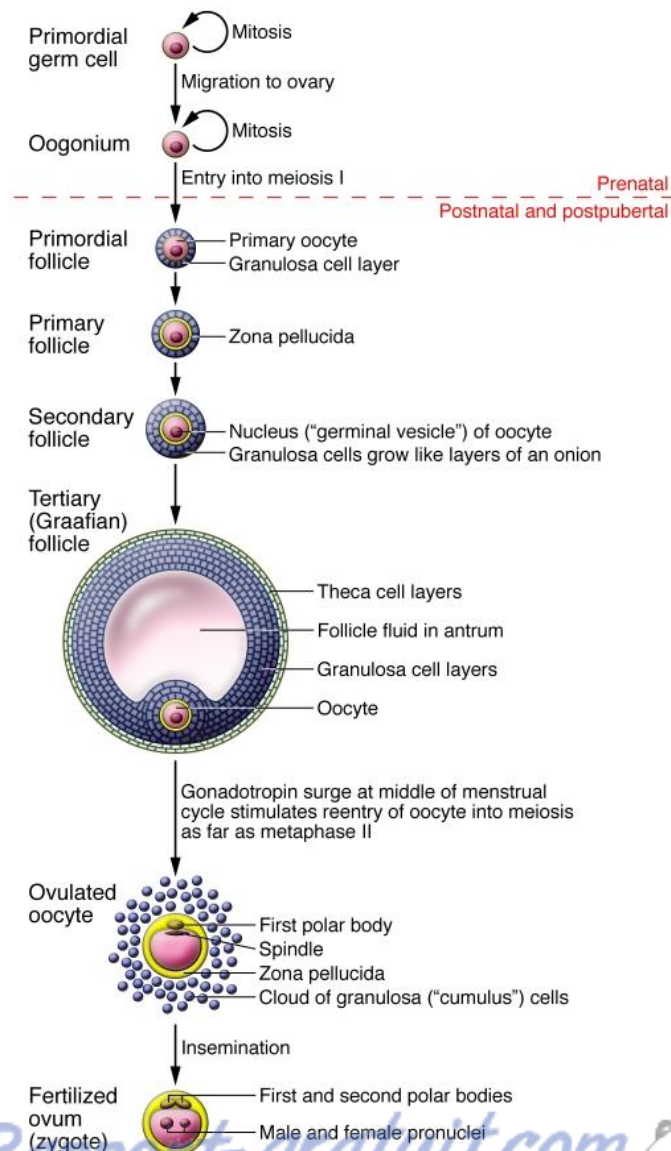


Figure 4 : Représentation des différents stades de la folliculogénèse (Gosden, 2010)

## b- Chronologie

La folliculogénèse suit la dynamique suivante (Figure 5) :

- Quiescence des follicules primordiaux
- Initiation de la croissance folliculaire de base

Cette étape correspond au passage du stade de follicule primordial à primaire. Le nombre de follicules sortant de la réserve par jour est proportionnel à la réserve ovarienne. Chez une femme de 20 ans, une vingtaine de follicules par jour initient ainsi leur croissance. L'ovocyte augmente en taille, de même que son noyau. A partir d'une certaine taille, l'envoi de signaux paracrines aux cellules péri-ovocytaires entraîne leur transformation en cellules cubiques, ainsi que leur multiplication. Les facteurs impliqués sont notamment le Kit-Ligand et son récepteur c-kit ; tandis que l'AMH, produite par les cellules de la granulosa des follicules primaires à antraux de 2-7 mm, exerce un rétrocontrôle négatif en inhibant l'initiation de la croissance des follicules primordiaux.

- Croissance folliculaire de base

Cette phase permet le passage du stade de follicule primaire au stade de follicule à antrum de 2-5 mm de diamètre. Elle implique des facteurs ovocytaires, tels que GDF9 et BMP15, nécessaires à la croissance des follicules primaires et à la formation des follicules secondaires.

- Développement folliculaire terminal

Cette dernière phase est sous la dépendance des gonadotrophines, avec pour conséquence un impact possible des traitements de stimulation de l'ovulation en FIV. D'une durée de 15 jours, elle est activée dès la régression du corps jaune du cycle précédent, et permet le passage d'un follicule de 2 mm de diamètre au stade pré-ovulatoire de 20 mm, avec une multiplication intense des cellules de la granulosa. Trois étapes successives sont à distinguer (Thibault, 2001) :

# Recrutement : Suite à la régression du corps jaune pendant la phase lutéale du cycle précédent, la chute conjointe de l'œstradiol et de l'inhibine A entraîne, par rétrocontrôle, l'augmentation de la FSH. Les follicules antraux recrutables, c'est-à-dire sensibles aux gonadotrophines, entrent alors en croissance terminale, constituant une cohorte de follicules. Pendant la phase folliculaire précoce, l'augmentation progressive de la FSH permet la multiplication des cellules de la granulosa, puis l'acquisition sur celles-ci de récepteurs à FSH, induisant ainsi l'expression d'une activité aromatasé convertissant les androgènes en estrogènes.

# Sélection : En milieu de phase folliculaire, sous l'effet de l'augmentation progressive de l'œstradiol et de l'inhibine B sécrétés par les follicules recrutés, le taux de FSH diminue. Seuls les follicules ayant le seuil de réponse à la FSH le plus bas (correspondant au nombre d'ovulation caractéristique de l'espèce) poursuivent leur croissance.

# Dominance : Cette phase voit la croissance et la maturation du follicule préovulatoire, la régression par atresie des autres follicules de la cohorte, et le blocage du recrutement de nouveaux follicules. Progressivement, le follicule passe de FSH à LH-dépendant, par

acquisition de récepteurs à LH sur la granulosa et pourra ainsi répondre à la décharge pré-ovulatoire de LH.

- Ovulation

L'ovulation correspond à l'expulsion de l'ovocyte hors du follicule. L'augmentation exponentielle de la sécrétion d'œstradiol par le follicule dominant exerce un rétrocontrôle positif sur la sécrétion de LH. L'ovulation survient alors environ 36 heures après le début du pic de LH. De nombreux remaniements morphologiques interviennent, comprenant l'arrêt des divisions cellulaires des cellules de la granulosa, la rupture des jonctions perméables entre les cellules de la granulosa, la dissociation des cellules du cumulus oophorus (sécrétion importante d'acide hyaluronique) sous l'effet de facteurs ovocytaires tels que GDF 9 et BMP 15, la pénétration des vaisseaux dans la granulosa, la tuméfaction de la thèque externe, l'aplatissement des cellules de l'épithélium ovarien, et enfin la contraction et la rupture folliculaire, avec la libération du liquide folliculaire. De nombreux facteurs folliculaires ou ovocytaires sont impliqués au moment de l'ovulation : l'œstradiol et la progestérone, des facteurs intervenant sur le système vasculaire et l'angiogenèse (oxyde d'azote, endotheline, système rénine-angiotensine, VEGF), des protéases (plasmine, collagénase, ADAM TS-1, cathepsine L), et des facteurs pro-inflammatoires (TNF  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , histamine, bradykinine).

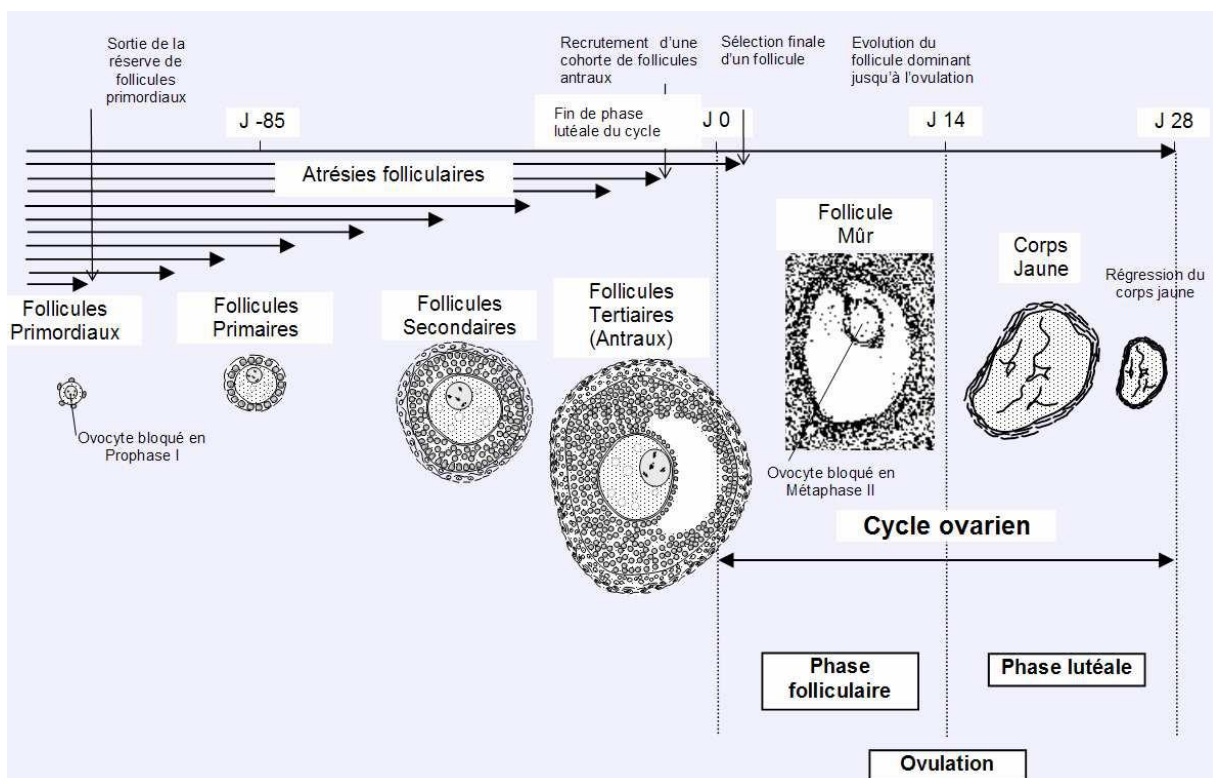


Figure 5 : Folliculogénèse, ovogénèse et cycle ovarien

### 3) Communication bidirectionnelle ovocyte/cumulus

Il existe un dialogue intense qui s'établit entre l'ovocyte et son microenvironnement folliculaire, selon deux types de mécanismes : les jonctions communicantes et les signaux paracrines. Ces échanges réciproques s'avèrent indispensables pour que les phénomènes de

folliculogénèse et d'ovogénèse s'effectuent de manière harmonieuse et coordonnée. Cet échange intéresse principalement les cellules du cumulus, qui malgré leur origine commune, se comportent très différemment des cellules de la granulosa murale. C'est à partir du stade tertiaire que les cellules du cumulus - composées de 5 000 à 8 000 cellules - se différencient des cellules de la granulosa et que s'intensifie le dialogue entre l'ovocyte et les cellules folliculeuses. Les facteurs sécrétés par l'ovocyte (GDF9, BMP15, BMP6, et les activines) seraient à l'origine de cette différenciation entre cellules du cumulus et cellules de la granulosa murale (Gilchrist, 2004 ; Diaz, 2007)

#### a- Jonctions communicantes

Les cellules de la corona radiata présentent à leur pôle apical des prolongements cytoplasmiques qui traversent la zone pellucide jusqu'à l'oolemme. A l'extrémité se trouvent des jonctions communicantes permettant la diffusion de certaines substances, de poids moléculaire inférieur à 1 kDa : ions, métabolites, seconds messagers (AMPc, GMPc), nucléotides et certains acides aminés (Anderson, 1976).

Structurellement, les jonctions communicantes sont formées de protéines de la famille des connexines. Ces sous-unités protéiques s'assemblent en hexamère pour former un connexon (Unger, 1999). Un connexon est constitué d'un seul type de connexines (connexon homomérique) ou de plusieurs types combinés ensemble (connexon hétéromérique). Lorsque deux extrémités de connexons cylindriques provenant de cellules adjacentes se touchent, ils forment un canal intercellulaire reliant les deux cellules. Si les deux connexons sont identiques, la jonction est dite homotypique, en revanche, deux connexons différents forment une jonction hétérotypique. Les connexines37 (Cx37) sont constitutives des jonctions entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa, tandis que les connexines 43 (Cx43) composent les jonctions qui se mettent en place entre les cellules de la granulosa elles mêmes.

Au fur et à mesure de la croissance folliculaire, les jonctions communicantes augmentent en nombre et en dimension (Larsen, 1988). A partir de l'ovulation, lors de la reprise de la méiose, les prolongements cytoplasmiques se rétractent et les jonctions communicantes entre l'ovocyte et les cellules du cumulus disparaissent (mais persistent entre les cellules du cumulus elles-mêmes). Cependant, l'intégrité du complexe cumulo-ovocyttaire reste indispensable pour le transport de celui-ci dans l'oviducte, via des phénomènes d'adhésion aux cellules épithéliales tubaires. La régulation de la communication par l'intermédiaire des gap-jonctions s'effectue par des réactions de phosphorylation des connexines, ainsi que par l'endocytose et la dégradation protéolytique des connexons.

La zone pellucide constituant une barrière imperméable à certaines protéines et sucres de haut poids moléculaire, les cellules du cumulus vont assurer un rôle nutritionnel essentiel à la croissance ovocyttaire (Buccione, 1990). Les cellules du cumulus absorbent de nombreuses substances et les transmettent à l'ovocyte via les jonctions communicantes. On estime qu'environ 85 % des nutriments nécessaires à la croissance de l'ovocyte transitent par les cellules folliculeuses (Feldmann, 2006). De plus, les cellules du cumulus ont la capacité de métaboliser préalablement certaines substances qui ne seraient pas directement assimilables par l'ovocyte. Les cellules du cumulus transforment ainsi le glucose en pyruvate, celui-ci étant ensuite acheminé à l'ovocyte et utilisé à des fins énergétiques. De la même façon, les cellules du cumulus métabolisent la cystine en cystéine, ensuite transmise à l'ovocyte pour la synthèse du glutathion. Le glutathion est alors impliqué dans la rupture des ponts disulfures permettant la décondensation de la chromatine du spermatozoïde, dans le remplacement des protamines par des histones (Perreault, 1988), dans la formation des pronuclei, et dans la protection anti-oxydante contre les radicaux libres

## b- Signaux paracrines

Des facteurs paracrines sont échangés de manière bidirectionnelle entre l'ovocyte et les cellules du cumulus, avec une boucle de régulation entre les deux partenaires. Les signaux paracrines diffusent selon un gradient de concentration, et permettent la différenciation des cellules folliculeuses les plus proches de l'ovocyte, créant alors un microenvironnement spécialisé autour de l'ovocyte (Feuerstein, 2012).

### · Facteurs exprimés par l'ovocyte

Le récepteur de type tyrosine-kinase *c-kit* est indispensable à l'initiation de la croissance folliculaire du pool de follicules primordiaux, à la prolifération des cellules de la granulosa, à la différenciation des cellules de la thèque, et à la formation de l'antrum (Hutt, 2006). Le facteur *Figa* (Factor in the germline  $\alpha$ ) régule la production de molécules d'adhésion permettant la cohésion entre l'ovocyte et les cellules somatiques essentiels à l'organisation initiale des follicules primaires (Soyal, 2000), ainsi que l'expression coordonnée des gènes *ZP1*, *ZP2* et *ZP3*. Les facteurs *GDF9* et *BMP15*, membres de la famille du TGF- $\beta$ , sont nécessaires à la folliculogénèse précoce, à la différenciation et à la prolifération des cellules de la granulosa. Ainsi, les femmes présentant une mutation hétérozygote de *BMP15* dans la région propeptide souffrent d'insuffisance ovarienne prématurée (Di Pasquale, 2004). Par ailleurs, *GDF9* intervient dans la mise en place de la matrice extra-cellulaire d'acide hyaluronique (Gilchrist, 2004), tandis que *BMP15* joue un rôle dans la protection des cellules du cumulus contre l'apoptose (Hussein, 2005). Au moment de l'ovulation, *GDF9* va également augmenter l'expression des gènes codant pour la cyclo-oxygénase-2 (*Cox-2*) et pour l'acide hyaluronique synthase-2 (*Has-2*). Par ailleurs, *BMP15* et *GDF9* entretiennent un système de régulation en boucle avec les facteurs *kit*/kitligand (Hutt, 2006).

### · Facteurs exprimés par les cellules du cumulus

Le facteur *Kit Ligand KL* intervient dans la croissance et la maturation ovocytaire, par son rôle anti-apoptotique sur les cellules germinales primordiales. Les récepteurs à la LH (*LHR*) et à la progestérone (*PR*) sont acquis par les cellules du cumulus lors de la maturation finale de l'ovocyte, suite à l'activation des récepteurs à la FSH. L'activation des LHR entraîne un influx calcique intracellulaire provenant des cellules du cumulus et du milieu extracellulaire via les jonctions communicantes. Les oscillations calciques sont indispensables à la rupture de la membrane nucléaire (GVBD), à la reprise de méiose, au blocage de la polyspermie, et à la décondensation du noyau mâle. La cyclo-oxygénase *Cox2* induit la synthèse de la prostaglandine E2, qui elle-même joue un rôle dans la rupture de la paroi folliculaire, l'expansion du cumulus et la maturation de l'ovocyte. *Has-2* induit la synthèse d'acide hyaluronique nécessaire à la formation de la matrice extra-cellulaire.

## **C- Mitochondrie et qualité ovocytaire/embryonnaire**

### **1) Généralités sur la mitochondrie et l'ADN mitochondrial**

La mitochondrie est un organite intracellulaire dont le rôle est de fournir de l'ATP à partir des molécules organiques. L'ATP est la principale source d'énergie de la cellule, par le processus de phosphorylation oxydative. L'ensemble des réactions qui fournissent de l'énergie au sein de la mitochondrie constitue la respiration cellulaire.

Les mitochondries sont formées d'une membrane externe, d'une membrane interne avec de nombreux replis ou crêtes et d'une matrice qui est l'espace entre les replis de la membrane interne (figure 6). Elles peuvent se multiplier en fonction des besoins énergétiques de la cellule.

Il existe environ 1000 protéines mitochondriales humaines. Elles sont majoritairement codées par l'ADN nucléaire. Cependant, les protéines de la membrane interne qui participent à la phosphorylation oxydative sont codées par l'ADN mitochondrial (ADNmt).

Le génome mitochondrial est transmis de façon maternelle, par le cytoplasme de l'ovocyte, au moment de la fécondation. L'ADNmt est un ADN circulaire double-brin sans intron contenant 37 gènes (figure 7) codant pour des 2 ARN ribosomiques, 22 ARN de transfert et 13 protéines membranaires impliquées dans la production d'énergie : cytochrome oxydase, ATP synthase, NADH déshydrogénase.

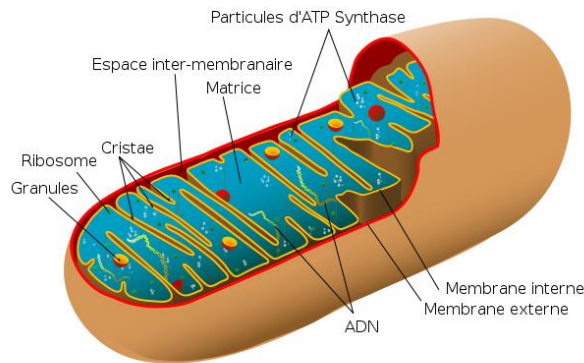


Figure 6 : Organisation schématique d'une mitochondrie

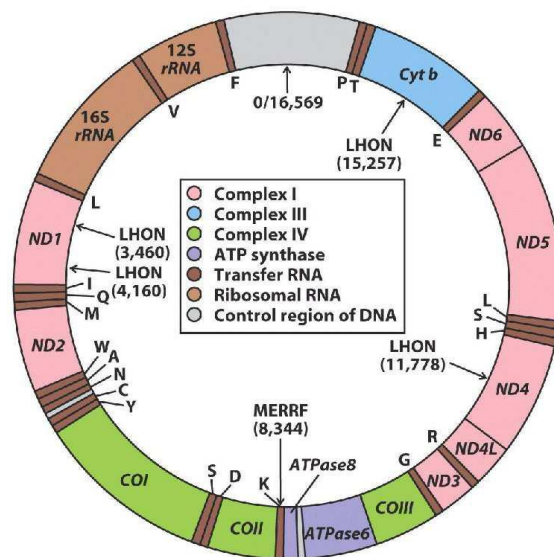


Figure 7 : Génome mitochondrial humain (Anderson, 1981)



## **2) Transmission maternelle à l'embryon**

La transmission maternelle de l'ADN mitochondrial est le dogme quasi général. Ainsi, après la fécondation, seules les mitochondries apportées par l'ovocyte sont conservées et serviront de réserve pour l'embryon au stade clivé. La transmission uniparentale de l'ADNmt implique l'élimination spécifique des mitochondries paternelles dans l'ovocyte, selon un mécanisme d'ubiquitylation d'une protéine membranaire mitochondriale, la prohibitine, dont les domaines sont masqués pendant le transit epididymaire (Thompson, 2003). Cette sélection permettrait de minimiser la transmission de mutations survenant dans le sperme exposé aux ROS pendant la spermatogenèse (Aitken, 1995). En effet, l'ADN mitochondrial mute très vite, mais la plupart des variations de séquence sont des polymorphismes neutres. Ceux-ci s'accumulent séquentiellement dans les lignées maternelles du fait de la transmission uniparentale de l'ADNmt. Ils peuvent alors se fixer dans les générations suivantes, et définir des groupes de populations appelés haplogroupes (Torroni, 1996). Ces variants mitochondriaux permettent de retracer l'évolution des populations et leurs migrations. En Europe, 10 haplogroupes englobent 99 % des ADN mitochondriaux.

## **3) Rôles de la mitochondrie dans l'ovogenèse et l'embryogenèse**

### a- Ovogenèse

Au cours de l'ovogenèse, le cytoplasme de l'ovocyte subit une croissance importante (son diamètre passe de 30 à 120 micromètres). La croissance ovocytaire s'accompagne d'une hausse importante du contenu mitochondrial (Dumollard, 2007; St John, 2010; Van Blerkom, 2011; Mahrous, 2012; Cotterill, 2013), avec plus de 250000 copies d'ADN mitochondrial chez l'humain (Steuerwald, 2000; Reynier, 2001; Barritt, 2002; May-Panloup, 2005; Santos, 2006; Zeng, 2007). Le contingent de mitochondries évolue donc beaucoup : il subit d'abord une restriction puis une intense amplification par expansion clonale d'un très petit nombre d'ADNmt sélectionnés : théorie du goulot d'étranglement génétique "bottleneck" (Figure 8) (Poulton, 1998).

Les ovogonies ne contiennent qu'une dizaine de copies d'ADNmt alors que les ovocytes matures en renferment jusqu'à plusieurs dizaines de milliers. Il se produit une expansion clonale à partir d'un très petit nombre d'ADNmt sélectionnés, ce qui permet à l'ovocyte de transmettre au nouvel individu une population homoplasmique d'ADNmt.

Ainsi, les cellules germinales primordiales (CGP) ne contiennent qu'une dizaine de copies d'ADNmt, alors qu'au niveau des crêtes génitales, elles en contiendraient un nombre proche de 100, avoisinant 200 après différenciation en ovogonies. Le nombre de mitochondries augmente ensuite de façon exponentielle : aux alentours de 6 000 pour un ovocyte au stade de prophase I d'un follicule primordial (Jansen, 1998), contre quelques centaines de milliers pour un ovocyte mature (Reynier, 2001).

Ce pool mitochondrial ovocytaire constituerait la réserve énergétique nécessaire au développement embryonnaire précoce. En effet, puisque l'ADNmt ne se réplique pas au cours de cette phase, le contingent mitochondrial ovocytaire doit être suffisant pour que sa répartition dans les différents blastomères embryonnaires permette le fonctionnement optimal de chaque cellule (Figure 9).

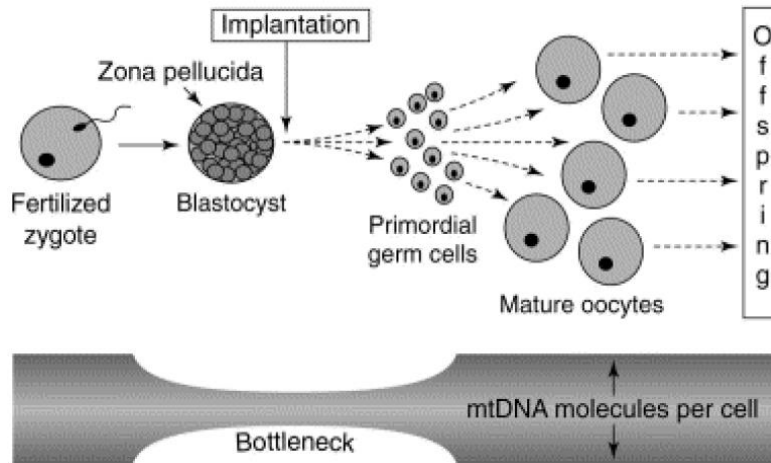


Figure 8 : Goulot d'étranglement génétique mitochondrial (Poulton, 1998).

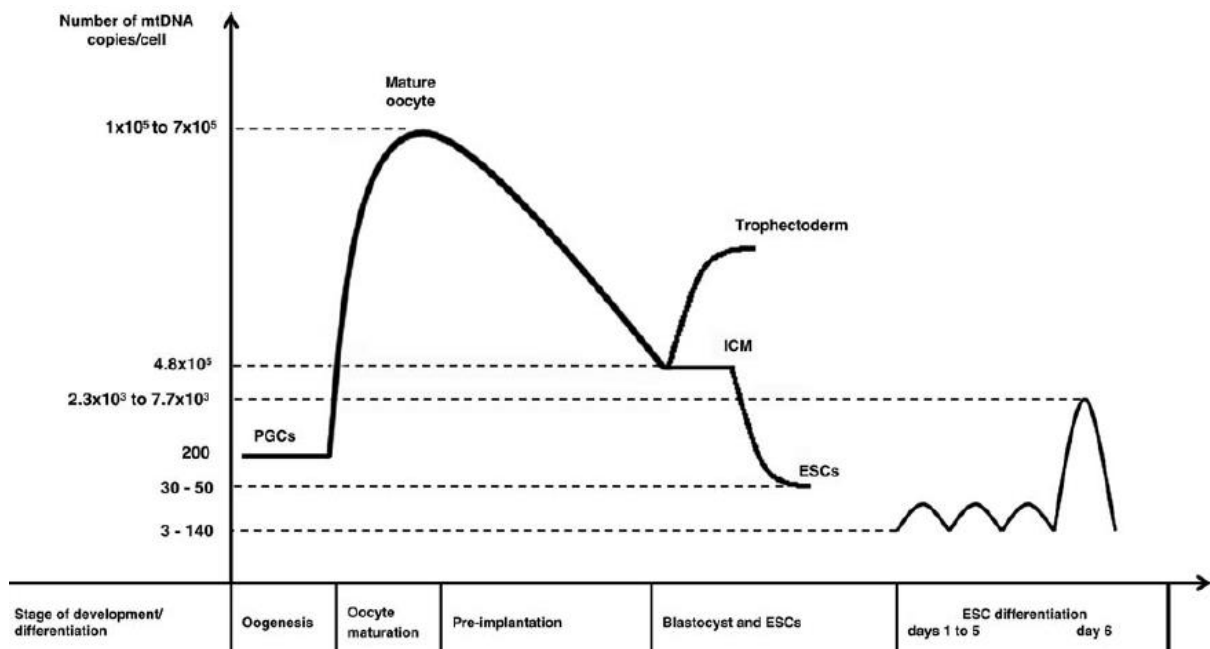


Figure 9 : Evolution du taux d'ADN mitochondrial pendant l'ovogenèse et l'embryogenèse précoce (St John, 2010)

Conjointement à cette augmentation du contingent mitochondrial, des modifications ultra-structurales se produisent, probablement en lien avec le taux de production d'ATP (Motta, 2000). Au cours de la maturation ovocytaire, le potentiel de membrane mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) augmente significativement (Van Blerkom, 2007), reflet d'une augmentation du métabolisme oxydatif.

Les mitochondries se réorganisent dans différentes zones cellulaires en fonction des demandes énergétiques. Pendant la maturation ovocytaire, les mitochondries sont retrouvées en clusters à proximité du réticulum endoplasmique, tandis qu'au stade de vésicule germinative, elles sont groupées autour du noyau, puis migrent à la périphérie de l'ovocyte après la GVBD. Dans les ovocytes en métaphase II, les mitochondries sont surtout présentes au niveau du fuseau méiotique (s'accumulant autour des pronuclei après la fécondation, et se maintenant près du noyau jusqu'au stade de morula).

La biogenèse mitochondriale durant l'ovogenèse est essentielle à la qualité ovocytaire : en effet, la qualité d'un ovocyte dépend du taux d'ADN mitochondrial qu'il contient (Reynier, 2001; Santos, 2006). La biogenèse mitochondriale est, par conséquent, essentielle à la qualité embryonnaire : les ovocytes avec des niveaux élevés d'ATP présentent des taux de fécondation et des taux de blastulation significativement plus élevés (Stojkovic, 2001). Plus précisément, un minimum de 2 pmol d'ATP par ovocyte serait nécessaire pour soutenir la fécondation, le développement de l'embryon et l'implantation (Van Blerkom, 1995).

#### b- Embryogenèse

La mitochondrie reste la principale source d'énergie jusqu'au stade de blastocyste (Leese, 1993). Le contenu global en ADNmt du conceptus ne change pas jusqu'au stade blastocyste : l'ADN mitochondrial ne se réplique pas jusqu'à l'implantation embryonnaire et l'ADN mitochondrial contenu dans l'ovocyte est presque le même que celui présent dans l'embryon préimplantatoire (Piko, 1987; Ebert, 1988; Thundathil, 2005; El Shourbagy, 2006; Kameyama, 2007; May-Panloup, 2007; St John, 2010).

## **D- Cellules folliculeuses et qualité ovocytaire / embryonnaire ?**

Il existe un système de signalisation bidirectionnelle entre l'ovocyte et les cellules folliculeuses qui l'entourent qui permet l'acquisition de la compétence ovocytaire (Gilchrist, 2004).

D'une part, les cellules folliculeuses ont les fonctions suivantes : elles supportent la croissance et la maturation ovocytaire par le biais de l'apport de nutriments et de facteurs de croissance. L'expression de certains gènes des cellules folliculeuses est liée à la qualité ovocytaire (Feuerstein, 2012; Assou, 2008), à la maturité ovocytaire initiale (Feuerstein, 2012; Assou, 2006), à la fécondabilité (Feuerstein, 2012; Cillo, 2007), à la qualité et au développement embryonnaires (Feuerstein, 2012; Mc Kenzie, 2004; Adriaenssens, 2010), ainsi qu'aux probabilités de grossesse (Wathlet, 2011; Assou, 2008). L'apoptose des cellules du cumulus constitue un facteur prédictif négatif de la qualité ovocytaire et de la survenue de grossesse (Lee, 2001).

D'autre part, l'ovocyte contrôle la différenciation, la prolifération et les fonctions des cellules folliculeuses via la sécrétion de facteurs paracrines appelés OSF (Oocyte-Secreted Factors) (Gilchrist, 2008).

Au final, la qualité de l'ovocyte résulte de la coopération étroite entre ces deux types cellulaires et une anomalie de la biogenèse mitochondriale ovocytaire aura des répercussions sur le fonctionnement des cellules folliculeuses (Boucret, 2015).

Du fait de l'étroite relation entre les cellules folliculeuses et l'ovocyte, l'étude des cellules folliculeuses est considérée comme une des meilleures approches non invasives de la qualité ovocytaire et des processus dont elle découle (McKenzie., 2004; Assou., 2006; Cillo, 2007; Feuerstein, 2007; Gasca, 2007; Assou, 2008; Hamel, 2008; van Montfoort, 2008; Adriaenssens, 2010; Wathlet, 2011; Feuerstein, 2012).

En particulier, l'étude de l'expression des gènes mitochondriaux des cellules folliculeuses pourrait donc permettre d'appréhender le rôle de la mitochondrie dans l'acquisition de la compétence ovocytaire au cours de la folliculogenèse. En effet, certains auteurs ont même

démontré un lien de corrélation positif entre la quantité d'ADN mitochondrial dans un ovocyte et dans les cellules folliculeuses correspondantes (Boucret, 2015). Ainsi, de même que l'ADN mitochondrial de l'ovocyte, celui des cellules folliculeuses entourant l'ovocyte pourrait participer au développement embryonnaire. Ainsi, lors d'une tentative d'AMP, la quantification de l'ADN mitochondrial de chaque cellule folliculeuse pourrait permettre d'affiner les critères de sélection embryonnaire via la qualité ovocytaire initiale.

## **Objectif de l'étude**

L'objectif principal de cette étude est de rechercher un lien possible entre le contenu en ADNmt des cellules folliculeuses et la qualité embryonnaire déterminée au deuxième jour du développement. Les autres objectifs de l'étude sont de rechercher un lien possible entre le contenu en ADMmt des cellules folliculeuses et :

- la maturité ovocytaire déterminée après décoronisation
- l'évolutivité embryonnaire jusqu'au stade blastocyste
- la probabilité d'implantation embryonnaire

Le contenu en ADNmt des cellules folliculeuses pourrait représenter un outil diagnostique supplémentaire de sélection embryonnaire.

## **Matériels & Méthodes**

### **A- Patients**

#### 1) Description de la population

La population étudiée correspond aux patientes prises en charge dans le centre d'AMP du CHU d'Angers, et ayant signé un consentement libre et éclairé.

#### 2) Recrutement

L'information est donnée au cours de l'entretien biologique réalisé avant toute tentative d'AMP. Les patientes sont informées oralement et par écrit de la nature des échantillons prélevés, des analyses génétiques potentiellement réalisables, des bénéfices attendus, des contraintes et risques prévisibles, ainsi que du droit au patient de refuser de participer à cette collection ou de demander la destruction de ses échantillons biologiques à tout moment. A l'issue de l'entretien, les lettres d'information et de consentement sont remises aux patientes.

L'accord (ou le refus) de la patiente de participer à l'étude est connu le jour de la tentative, le consentement daté et signé étant rendu ce jour-là au laboratoire. Le consentement est remis au biologiste, qui en cas d'accord de la patiente, l'inclut ou non en fonction des critères de sélection. Si la patiente est sélectionnée, une copie du consentement lui est adressée.

Les données utilisées dans le cadre de cette étude sont recueillies dans les dossiers médicaux des patients suivis dans le service d'AMP du CHU d'Angers, dans le cadre de leur prise en charge de routine. Aucune procédure supplémentaire de traitement, de diagnostic ou de surveillance n'est proposée dans le cadre de cette étude.

### 3) Critères de sélection

Toutes les patientes ayant signé le consentement de participation à l'étude et ayant eu une ICSI entre février et mai 2015 au CHU d'Angers sont incluses de manière prospective.

## **B- Collection échantillons**

Il s'agit d'une recherche non interventionnelle, avec constitution d'une collection concernant les cellules folliculeuses. La constitution de cette collection intitulée "Fertilité et Qualité ovocytaire" a reçu l'aval du comité d'éthique du CHU d'Angers en Novembre 2010 (numéro CB 2010-06).

Les ovocytes utilisés pour cette étude sont recueillis au cours de cycles de fécondation in vitro avec ICSI réalisés au CHU d'Angers entre février et mai 2015.

La stimulation ovarienne nécessaire à ces cycles de fécondation in vitro utilise des gonadotrophines recombinantes (Puregon®, Organon, Gonal F®, Merck Serono, Pergoveris® Merck Serono) ou des gonadotrophines urinaires ménopausiques d'origine humaine (Menopur®, Ferring). Le blocage de l'ovulation est assuré soit par un agoniste du GnRH (Décapeptyl®, Ipsen Biotech) débuté en milieu de phase lutéale, soit par des antagonistes du GnRH (Orgalutran®, Organon, Cetrotide®, Merck Serono). Le déclenchement de l'ovulation par 6 500 unités d'hCG recombinante (Ovitrelle®, Merck Serono) est décidé sur les critères échographiques ( $\geq 5$  follicules d'au moins 17 mm de diamètre) et biologiques (œstradiol plasmatique).

La ponction folliculaire est réalisée par voie transvaginale 36 heures après le déclenchement de l'ovulation. L'examen du liquide de ponction folliculaire à la recherche des complexes cumulo-ovocytaires (CCO) est effectué à l'aide d'une loupe binoculaire munie d'une platine chauffante maintenue à 37°C. Les CCO recueillis sont ensuite placés à l'étuve à 37°C sous 5 % de CO<sub>2</sub> dans l'air, dans un milieu de culture approprié (Flushing Medium®, Origio, Malov, Danemark).

Dans le cadre d'une ICSI, la décoronisation est réalisée avant l'injection de spermatozoïdes. Elle est effectuée ovocyte par ovocyte, par une exposition de 30 secondes environ à 50 µl de Hyaluronidase (80 UI/mL, FertiPro, Beernem, Belgique) diluée au quart avec du Fercult®, puis par micro-pipetage à l'aide d'une pipette stripper calibrée à 125 µm (Origio, Malov, Danemark). Un même opérateur réalise toutes les décoronisations des cohortes de toutes les patientes incluses.

Une ICSI est réalisée uniquement sur les ovocytes matures, en métaphase II. Les ovocytes immatures ont également été retenus dans l'étude et, hormis les ovocytes lysés à la décoronisation, l'ADN mitochondrial de toutes les cellules folliculeuses a été extrait.

Les cellules folliculeuses, qui ne jouent à ce stade plus aucun rôle ni dans la fécondation ni dans le développement embryonnaire, sont habituellement jetées. Dans le cadre de cette étude non invasive, les cellules folliculeuses de chaque cumulus isolé sont reprises dans 500µL de Fercult®. Ces fractions sont ensuite lavées par centrifugation 10 min à 1200 g, et les culots asséchés de cellules folliculeuses sont congelés immédiatement dans l'azote liquide.

Les cellules folliculeuses sont ensuite conservées à -80°C jusqu'à extraction d'ADN réalisée de manière groupée après réception de l'ensemble des échantillons d'intérêt.

## C- Extraction ADN mitochondrial

L'extraction de l'ADN de l'ensemble des échantillons est réalisée sur colonne avec membrane de silice avec le kit « Nucleospin® Tissue » de Macherey-Nagel, Duren, Allemagne (Figure 10). Dans un premier temps, la lyse cellulaire est obtenue par incubation, à 70°C pendant 10 min, de chaque échantillon avec 200 µL de tampon T1 de SDS (agent détergent), de 25 µL de protéinase K (protéase inactivant DNases et RNases) et de 200 µL de tampon B3 de chlorure de guanidine (agent chaotropique). L'ajout de 210 µL d'éthanol absolu permet d'ajuster les conditions de fixation de l'ADN, et celui-ci, chargé négativement, peut alors se fixer sur le filtre d'une colonne chargé positivement. Après une première centrifugation d'une minute à 11 000 g, un premier lavage par 500 µL de tampon BW (guanidine + isopropanol) est effectué, suivi d'une nouvelle centrifugation d'une minute à 11 000 g, puis un deuxième lavage par 600 µL de tampon B5, suivi à nouveau d'une centrifugation. Enfin, l'ADN fixé sur la colonne est élué par 60 µL de tampon d'éluion BE (5mM Tris/HCl, pH 8.5) préchauffé à 70°C. Le volume élué est repassé sur la colonne et centrifugé une nouvelle fois pour augmenter le rendement de l'extraction.











2	Pre-lyse sample		200 µL T1 25 µL Proteinase K
3	Lyse sample		200 µL B3 70 °C, 10 min
4	Adjust DNA binding conditions		210 µL 96–100 % ethanol
5	Bind DNA	 	Load all 11,000 x g, 1 min
6	Wash silica membrane	 1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> 	1 <sup>st</sup> wash 500 µL BW 2 <sup>nd</sup> wash 600 µL B5 11,000 x g, 1 min
7	Dry silica membrane		11,000 x g, 1 min
8	Elute highly pure DNA	 	60 µL BE (70 °C) RT, 1 min 11,000 x g, 1 min

Figure 10 : protocole d'extraction de l'ADN avec le kit NucleoSpin® Tissue de Macherey-Nagel



## **D- Quantification de l'ADN mitochondrial**

Afin de déterminer le nombre de copies d'ADN mitochondrial dans les cellules folliculeuses, une PCR quantitative est réalisée en utilisant le CFX 96 Manager de Biorad®. Il s'agit d'une PCR multiplex dans laquelle 3 gènes sont analysés pour chaque puit. Les amorces utilisées permettent d'amplifier 2 gènes mitochondriaux (COX1 et ND4) et un gène nucléaire ( $\beta$ 2-microglobuline). Pour chaque échantillon analysé, 2 prises d'essai lors d'un même run sont réalisées. Sur chaque plaque, une gamme étalon et un échantillon témoin ont été analysés et leurs coefficients de variation (CV) sont calculés. Le CV est le rapport de l'écart-type à la moyenne : plus la valeur du CV est élevée, plus la dispersion autour de la moyenne est grande.

L'amplification est réalisée comme suit : dénaturation initiale à 95°C pendant 10 minutes, 50 cycles à 95°C pendant 45 secondes, 58°C pendant 1 minute et 72°C pendant 45 secondes.

Le signal est recueilli sous forme de fluorescence. La valeur obtenue est exprimée sous forme de ratio entre la quantité d'ADN de COX1 et de NO4 sur la quantité d'ADN de  $\beta$ 2-microglobuline.

## **E- Critères de jugement**

### **1) Critère de jugement principal : qualité embryonnaire**

La qualité embryonnaire est déterminée à partir de la morphologie des embryons. Nous utilisons les travaux d'une réunion d'experts de la société européenne de reproduction humaine et d'embryologie sur la classification embryonnaire (Balaban, 2011). Les différents critères utilisés pour la classification embryonnaire sont les suivants :

- le nombre de blastomères
- la régularité des différents blastomères
- le pourcentage de fragmentation au sein de l'embryon
- la présence ou non de blastomères multinuclés

En fonction de ces différents critères, les experts répartissent les embryons en 2 groupes selon leur qualité (tableau II)

Tableau II : Classification de la qualité embryonnaire selon leur morphologie au stade clivé J2

	Nombre de blastomères	Régularité et fragmentation	BMN
Embryons d'excellente qualité (tous les critères doivent être présents)	4 +/- 1	Blastomères réguliers ET Fragmentation < 10%	Absence
Embryons de qualité inférieure (un des facteurs doit être présent)	< 3 ou > 5	Blastomères irréguliers ou Fragmentation > 10%	Absence ou Présence

### **2) Critères de jugement secondaires**

#### **a- Maturité ovocytaire**

Après avoir retiré les cellules folliculeuses entourant les ovocytes, la maturité ovocytaire est déterminée. On peut alors observer les ovocytes à plusieurs stades :

- matures : en métaphase de deuxième division méiotique, ils ont alors expulsé leur premier globule polaire dans l'espace péri-vitellin, témoin de la fin de la première division de méiose
- immatures : sans globule polaire expulsé ou sous la forme d'une vésicule germinale (ils sont alors en prophase de première division méiotique)
- lysé ou atrétique.

#### b- Evolutivité embryonnaire

L'évolutivité embryonnaire distingue les embryons s'étant développés jusqu'au stade blastocyste de ceux n'ayant pas atteint ce stade.

#### c- Implantation embryonnaire

L'implantation embryonnaire est objectivée par la positivité de la  $\beta$ -hCG lors du dosage suivant le transfert embryonnaire.

## **F- Statistiques**

Les données catégorielles sont résumées par leurs effectifs (proportion) et les données quantitatives sont résumées par leur moyenne  $\pm$  écart-type. Les comparaisons entre les variables ont été réalisées par des tests non paramétriques : test exact de Fisher pour les variables qualitatives et tests de Wilcoxon et de Kruskal-Wallis pour les variables quantitatives.

Les critères de jugement sont analysés séparément par des analyses univariées puis multivariées en utilisant un modèle de régression logistique pour lequel les variables ont été binarisées.

Tous les tests sont bilatéraux et le risque de première espèce est fixé à 0,05. Les calculs statistiques sont réalisés avec le logiciel SPSS (SPSS Inc, Chicago).

## **Résultats**

### **A- Caractéristiques de la population**

Nous avons recueilli 515 ovocytes au cours des cycles de stimulation de 64 patientes dans notre étude. L'âge et le BMI moyens sont respectivement de 32.64 ans et de 24.84 kg/m<sup>2</sup>.

Les patientes incluses sont des patientes pour lesquelles nous avons réalisée une ICSI dont la ponction a eu lieu entre le 5 février et le 22 juin 2015. Les indications de l'ICSI étaient d'origine spermatique essentiellement : 53 des 64 patientes (83%).

Au total, 515 ovocytes ont été recueillis lors des ponctions ovocytaires (en moyenne 7,8 ovocytes par patiente ponctionnée). L'ADN mitochondrial des cellules folliculeuses entourant 16 ovocytes lysés ou atrétiques n'a pas été extrait. Donc, l'ADN mitochondrial des cellules folliculeuses de 499 des 515 ovocytes recueillis a été extrait pour quantification.

375 des 515 ovocytes observés après la décoronisation étaient au stade de métaphase de seconde division méiotique, soit, matures pour l'injection. Sur les 375 ovocytes matures injectés, 233 ont été fécondés donnant des embryons clivés 48 heures après l'injection.

52 des 64 femmes de la cohorte ont bénéficié d'un transfert embryonnaire. Le nombre total d'embryons transférés est de 74 (soit un nombre moyen de 1,42 embryon transféré par transfert). Parmi les 52 femmes ayant bénéficié d'un transfert, 34 n'ont pas obtenu de grossesse, 11 ont obtenu une grossesse clinique évolutive, 3 une GEU ou une fausse couche et 4 une grossesse biochimique. Le taux de grossesse par transfert est donc de 34,6% (figure 11).

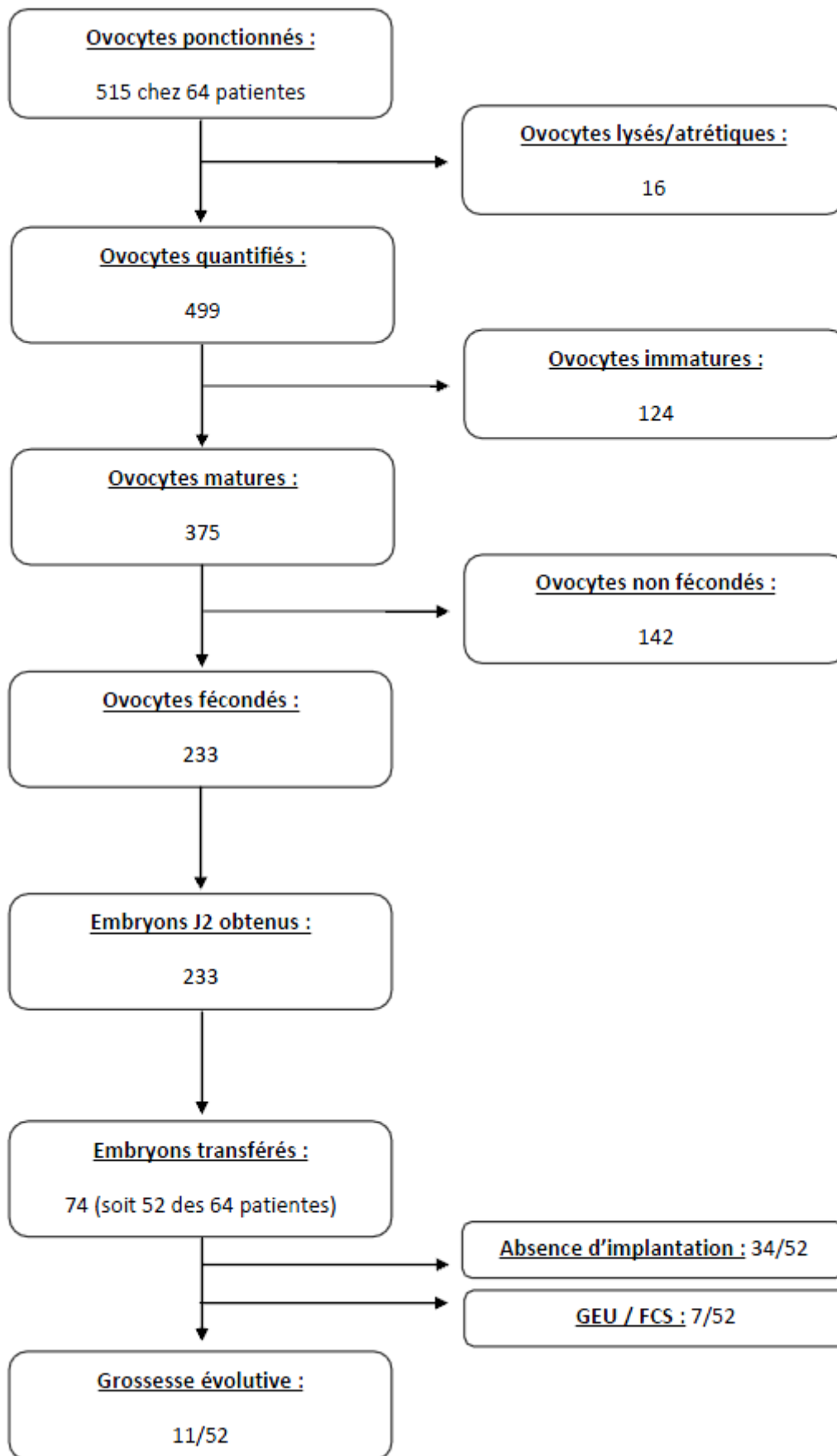


Figure 11 : Diagramme de flux de la population

## **B- Echantillons et quantification de l'ADN mitochondrial**

Les 499 échantillons correspondant aux cellules folliculeuses entourant un ovocyte non lysé et non atréctique ont été extraits. Parmi ces échantillons, 45 n'ont pas pu être quantifié pour cause de volume insuffisant, correspondant à 20 des 64 patientes de la cohorte. Au sein des 45 échantillons n'ayant pas été analysés, 14 correspondent à des embryons qui ont été ultérieurement transférés.

Pour la gamme, les CV sont en moyenne de 2.33% pour le gène COXI, de 3.57% pour le gène ND4 et de 3.51% pour le gène de la  $\beta$ -2-microglobuline. Pour l'échantillon d'ADN contrôle, les CV sont de 3.2% pour le gène COXI, de 2.99% pour le gène ND4 et de 3.94% pour le gène de la  $\beta$ -2-microglobuline.

La valeur moyenne de l'ADN mitochondrial quantifié au sein des cellules folliculeuses entourant les 454 ovocytes des patientes de la cohorte était de 1626 copies.

## **C- Critère de jugement principal : qualité embryonnaire et ADNmt**

### **1) Analyse univariée**

Les embryons sont classés selon la classification du tableau II. Ils sont répartis en deux groupes : d'une part, les embryons d'excellente qualité et d'autre part, les embryons de qualité inférieure.

La qualité embryonnaire au deuxième jour du développement est liée à la quantité d'ADNmt ( $p=0,014$ ) : dans le groupe qualité embryonnaire excellente et dans le groupe qualité embryonnaire inférieure, les moyennes de quantité d'ADNmt sont respectivement de 2259 et de 1371 (figure 12).

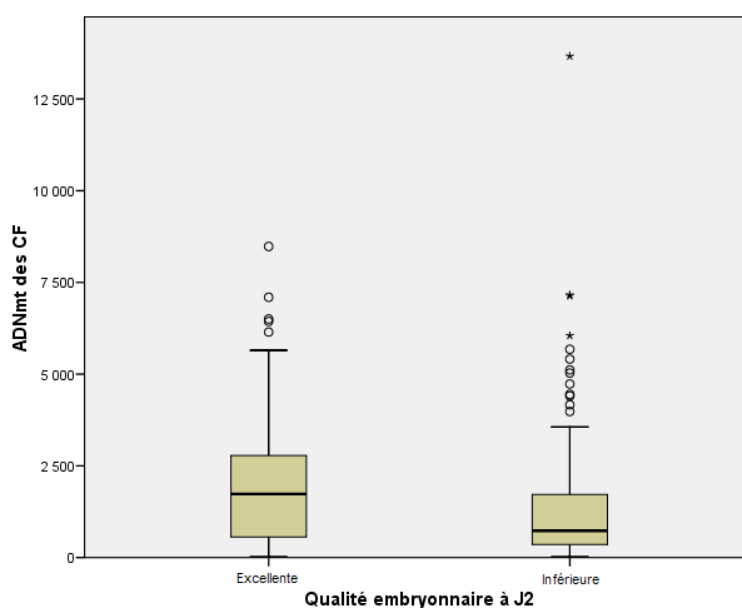


Figure 12 : Quantité d'ADNmt des cellules folliculeuses (CF) en fonction de la qualité embryonnaire.

Parmi les critères définissant la qualité embryonnaire, la quantité d'ADNmt n'est liée ni au nombre de cellules de l'embryon à J2 ( $p=0,310$ ), ni à la régularité embryonnaire ( $p=0,12$ ), ni à la fragmentation embryonnaire ( $p=0,91$ ).

La qualité embryonnaire observée dans cette étude est liée à aucun autre paramètre relatif à la patiente ou à la stimulation (tableau III).

En outre, la qualité au deuxième jour de développement est également liée à la probabilité d'implantation de l'embryon: la probabilité d'implantation est meilleure chez les embryons de qualité excellente que chez les embryons de qualité inférieure ( $p=0,025$ ).

Tableau III : Influence des différents paramètres de la tentative sur les critères de jugements (analyse univariée).

		Critère de jugement primaire	Critère de jugement secondaire		
		Qualité embryonnaire	Maturité ovocytaire	Evolutivité embryonnaire	Implantation embryonnaire
Effectif		201	448	84	46
Degré de significativité	Quantité d'ADNmt	0,014*	0,40	0,15	0,42
	Age féminin	0,29	0,66	0,60	0,49
	BMI	0,35	0,001*	0,401	0,73
	Tabagisme féminin	0,32	0,54	0,59	0,98
	Type de blocage de l'ovulation	0,95	0,53	0,19	0,81
	Type de protocole de stimulation	0,64	< 0,001*	0,53	0,58
	Dose totale de FSH	0,058	0,02*	0,67	0,76
* résultats statistiquement significatifs ( $p<0,05$ )					

## **2) Analyse multivariée**

Prenant en compte les éléments retrouvés dans l'analyse univariée et ceux connus dans la littérature pour influencer sur la qualité embryonnaire, la qualité embryonnaire au deuxième jour du développement est liée à la quantité d'ADNmt ( $p=0,005$ ), à l'âge féminin ( $p=0,043$ ), à la dose totale de FSH administrée ( $p=0,02$ ) et avec aucune autre covariable (tableau IV) : ainsi, les embryons de qualité excellente sont majoritairement retrouvés chez : des femmes plus jeunes ayant reçu une dose plus importante de FSH et dont les cellules folliculeuses contiennent une quantité plus importante d'ADNmt (tableau V).



Tableau IV : Influence des différents paramètres de la tentative sur les critères de jugements (analyse multivariée).

		Critère de jugement primaire	Critère de jugement secondaire		
		Qualité embryonnaire	Maturité ovocytaire	Evolutivité embryonnaire	Implantation embryonnaire
Effectif		201	448	84	46
Degré de significativité	Quantité d'ADNmt	0,005*	0,58	0,11	0,40
	Age féminin	0,043*	0,76	0,49	0,49
	BMI	0,68	0,005*	0,44	0,72
	Tabagisme féminin	0,78	0,21	0,94	0,97
	Type de blocage de l'ovulation	0,56	0,51	0,62	0,81
	Type de protocole de stimulation	0,51	< 0,001*	0,15	0,57
	Dose totale de FSH	0,02*	0,734	0,67	0,76
* résultats statistiquement significatifs (p<0,05)					

Tableau V : Paramètres liées à la qualité embryonnaire en analyse multivariée

		Age féminin moyen (p=0,043)	Dose moyenne de FSH administrée (p=0,02)	Quantité moyenne d'ADNmt des CF (p=0,005)
Qualité embryonnaire	Excellente	31,53	2271	2259
	Inférieure	32,32	1963	1371

## **D- Critères de jugement secondaires**

### **1) Analyse univariée**

#### **a- Maturité embryonnaire**

La maturité ovocytaire déterminée après déconisation des ovocytes est liée au BMI (p=0,001), au type de protocole de stimulation (p<0,001) ainsi qu'à la dose totale de FSH administrée (p=0,02) (tableau III).

#### **b- Evolutivité et implantation embryonnaire**

En revanche, l'évolutivité embryonnaire et la probabilité d'implantation embryonnaire ne sont liées avec aucune des différentes covariables analysées (tableau III).

### **2) Analyse multivariée**

#### **a- Maturité ovocytaire**

En analyse multivariée, la maturité ovocytaire est liée au BMI (p=0,001) et au type de protocole de stimulation (p<0,001) (tableau IV) : la proportion d'ovocytes matures est significativement plus importante chez les femmes avec un BMI faible (tableau VI) et ayant reçu une stimulation par FSH recombinante seule (tableau VII).

Contrairement à l'analyse univariée, la maturité ovocytaire n'est pas liée à la dose totale de FSH administrée en analyse multivariée ( $p=0,87$ ).

Tableau VI : Maturité ovocytaire en fonction du BMI moyen

	Ovocytes matures	Ovocytes immatures
BMI moyen ( $p=0,001$ )	24,91	26,58

Tableau VII : Maturité ovocytaire en fonction du type de stimulation administrée

	Ovocytes matures	Ovocytes immatures
FSH recombinante seule	271 (78%)	77
FSH urinaire seule	51 (61%)	32
FSH recombinante + urinaire	3 (33%)	6

#### b- Evolutivité et implantation embryonnaire

En analyse multivariée, l'évolutivité et l'implantation embryonnaire ne sont liées à aucune des différentes variables (tableau IV).

## **E- ADN mitochondrial**

Nous avons recherché les facteurs qui étaient liés à la quantité d'ADNmt des cellules folliculeuses.

### **1) Analyse univariée**

Une augmentation du BMI féminin est liée à une diminution de la quantité d'ADNmt ( $p=0,006$ , corrélation négative) (tableau VIII).

Tableau VIII : Influence des différents paramètres de la tentative sur la quantité d'ADNmt (analyse univariée).

	Quantité d'ADNmt
Age féminin	0,088
BMI	0,006*
Tabagisme féminin	<0,001*
Type de blocage de l'ovulation	0,57
Type de protocole de stimulation	0,14
Dose totale de FSH	0,36
* résultats statistiquement significatifs ( $p<0,05$ )	

D'autre part, on retrouve un taux d'ADNmt plus élevé chez les patientes exposées au tabac que chez les patientes non exposées (2150 et 1323 respectivement,  $p<0,001$ ) (figure 13 et tableau VIII).

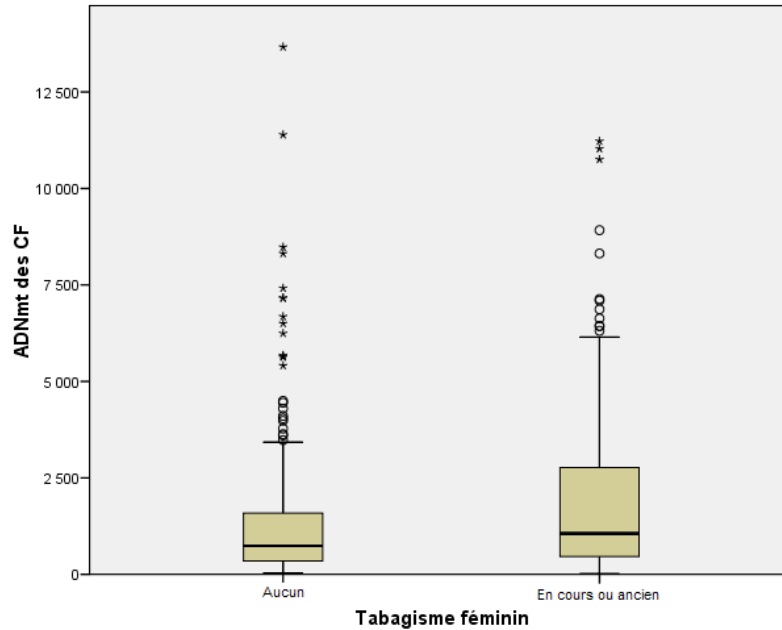


Figure 13 : Quantité d'ADNmt des cellules folliculeuses (CF) en fonction de l'exposition tabagique féminine.

## 2) Analyse multivariée

En analyse multivariée, l'augmentation de l'âge féminin d'une part ( $p=0,004$ ) et l'exposition tabagique d'autre part ( $p<0,001$ ) sont liées à une augmentation de la quantité d'ADNmt ; une augmentation du BMI est liée à une diminution de la quantité d'ADNmt ( $p=0,004$ ) (tableau IX).

Tableau IX : Influence des différents paramètres de la tentative sur la quantité d'ADNmt (analyse multivariée).

	Quantité d'ADNmt
Age féminin	0,004*
BMI	0,032*
Tabagisme féminin	<0,001*
Type de blocage de l'ovulation	0,57
Type de protocole de stimulation	0,31
Dose totale de FSH	0,09
* résultats statistiquement significatifs ( $p<0,05$ )	

Dans le groupe des patientes n'ayant jamais été exposé au tabagisme ( $n=41$ ), nous remarquons que la quantité d'ADNmt des cellules folliculeuses entourant les ovocytes à l'origine d'embryons de qualité excellente est significativement plus élevée que celle des cellules folliculeuses à l'origine d'embryons de qualité non excellente (2276 et 1371 respectivement,  $p=0.011$ ) (figure 14).

En revanche, dans le groupe des patientes en cours de tabagisme actif ( $n=16$ ), les quantités d'ADNmt dans les cellules folliculeuses entourant les ovocytes donnant des embryons de qualité excellente n'est pas différente de celle des cellules folliculeuses à l'origine d'embryons de qualité non excellente ( $p=1$ ).

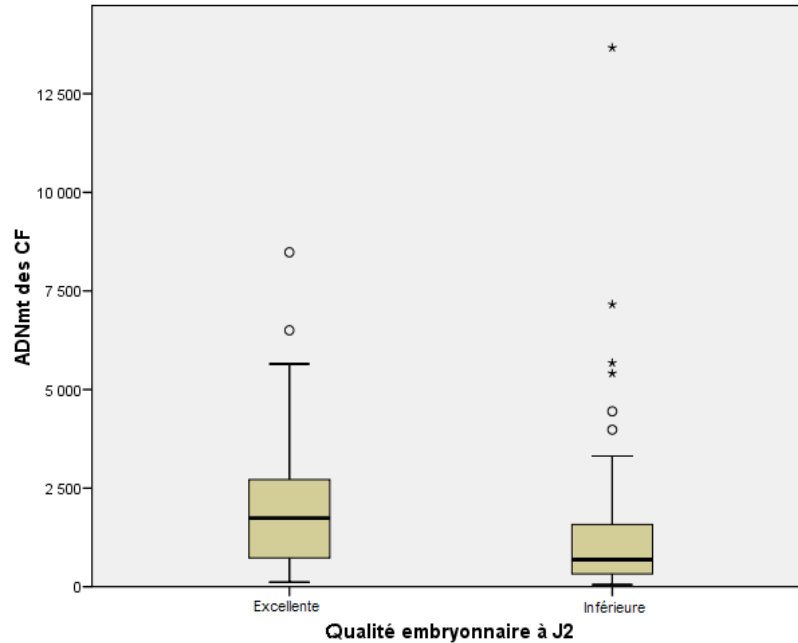


Figure 14 : Quantité d'ADNmt des cellules folliculeuses (CF) chez les patientes non fumeuses en fonction de la qualité embryonnaire.

## **F- Paramètres spermatiques**

Dans notre série, les paramètres spermatiques ne sont liés ni à la qualité embryonnaire, ni à l'évolutivité, ni à l'implantation embryonnaire (tableau X).

Tableau X : Influence des paramètres spermatiques sur les critères de jugements (analyse univariée).

	Qualité embryonnaire	Évolutivité embryonnaire	Implantation embryonnaire
Concentration en spermatozoïdes mobiles dans la préparation	p = 0.158	p = 0.748	p = 0.411

## **Discussion**

### **A- Biais et analyse critique des méthodes**

Nous avons étudié les cellules folliculeuses récupérées après décoronisation des ovocytes ponctionnés à l'issue des protocoles de stimulation en vue d'ICSI. A partir de ces cellules, l'ADN a été extrait puis quantifié.

Bien que, dans la majorité des cas, l'indication d'ICSI était l'altération des paramètres spermatiques, une partie de la cohorte relevait d'autres indications et avait un bilan masculin

normal ou subnormal. Ainsi, les paramètres spermatiques au sein de la cohorte pouvaient être sensiblement différents en fonction des couples. Malgré une répercussion possible de cette variabilité du sperme sur les paramètres embryonnaires, nous avons montré dans notre étude, que les paramètres spermatiques n'étaient liés ni à la qualité embryonnaire ni à l'évolutivité, ni à l'implantation de l'embryon.

Les injections de spermatozoïdes sont réalisées par les différents techniciens du laboratoire, la qualité embryonnaire est déterminée par différents opérateurs et le transfert embryonnaire est effectué par les différents gynécologues du service. Il était difficile de changer la procédure habituelle pour notre étude. En revanche nous avons tenté de limiter les biais inhérents à la variabilité inter-opérateur en faisant en sorte que la décoronisation des ovocytes et la quantification de l'ADN soient effectuées par une seule personne et que l'extraction de l'ADN soit effectuée par deux personnes travaillant en binôme.

Chaque échantillon est déposé dans deux puits adjacents appartenant à la même plaque. Ainsi, on réalise deux prises d'essai d'un même échantillon dans un même cycle de quantification. On ne retrouve pas de différence significative de quantité d'ADN entre les deux puits, majorant donc l'exactitude de la méthode.

Deux gènes mitochondriaux sont quantifiés pour chaque échantillon. Le résultat final est un ratio entre la moyenne de quantité de chacun des deux gènes mitochondriaux sur la quantité d'ADN d'un gène nucléaire, augmentant encore la l'exactitude.

Parmi les 499 ovocytes extraits, l'ADNmt des cellules folliculeuses de 45 d'entre eux n'a pas pu être quantifié. En effet, pour ces échantillons, le volume disponible était trop faible pour l'analyse. Nous avons remarqué que 75% de ces échantillons (34/45) étaient situés en bordure de plaque, remettant en cause l'étanchéité des films plastiques protecteurs ayant pu entraîner une évaporation d'une partie du matériel biologique et rendant l'analyse aléatoire.

De la même manière, lors de l'analyse des résultats, nous avons remarqué que la majorité des valeurs aberrantes retrouvées (outliers) étaient situées sur les plaques 8 et 9, respectivement 8 et 3 valeurs aberrantes sur 11 au total. Ces chiffres nous montrent que l'on peut s'interroger sur la variabilité inter-plaque. La PCR multiplex est certes une méthode très fiable mais dans une gamme de mesure seulement ; au delà, les erreurs de quantification sont exponentielles pouvant expliquer certaines valeurs aberrantes retrouvées. Cependant, la comparaison des coefficients de variation des gammes d'étalonnage et de l'échantillon d'ADN contrôle de chaque plaque montre que l'efficacité est similaire entre les plaques et donc permet de s'affranchir de la variabilité inter-plaque.

## **B- Présentation des résultats et comparaison avec d'autres travaux.**

### **1) Mitochondrie et qualité embryonnaire**

La mitochondrie joue un rôle central dans la qualité gamétique puis embryonnaire comme le prouvent les expériences de transferts de cytoplasme ou de mitochondries qui permettent d'améliorer la compétence ovocytaire et de soutenir le développement embryonnaire. En particulier, la masse mitochondriale reflétée par le taux d'ADNmt est essentielle au développement de l'embryon avant la phase de différenciation, au moment de la reprise de la biogenèse mitochondriale (May-Panloup, 2005; Fragouli, 2015).

Ainsi, dans l'espèce humaine, l'injection d'une fraction de cytoplasme d'un ovocyte jeune dans un ovocyte âgé permet de restaurer la compétence de ce dernier à soutenir le développement embryonnaire (Cohen, 1997). Plusieurs tentatives ont conduit à l'obtention de grossesses évolutives avec une cinquantaine de naissances (Cohen, 1997; Huang, 1999; Lanzendorf, 1999; Barritt, 2001; Barritt, 2001; Dale, 2001). A cette époque, ces techniques ont été interdites chez l'homme, compte tenu de l'absence de réel recul sur les risques encourus. Plusieurs facteurs du cytoplasme ovocytaire peuvent être responsables de cette restauration de la compétence ovocytaire. Néanmoins, le transfert de mitochondries isolées est capable à lui seul de restaurer la capacité de production d'ATP par l'ovocyte receveur (Van Blerkom, 1998) et de diminuer l'apoptose ovocytaire (Perez, 2000). De nombreuses études chez l'animal ont montré que le transfert de cytoplasme ou de mitochondries isolées réduit la fragmentation, augmente les taux de clivages embryonnaires, donne des embryons capables de s'implanter et des individus sains (Chappel, 2013).

Ces techniques, qui viennent d'être autorisées au Royaume-Uni dans le cadre des maladies mitochondriales, soulèvent cependant le problème du risque de l'origine tri-parentale de l'individu. Celle-ci est liée à l'hétéroplasmie qui découle de l'utilisation de mitochondries, ou de cytoplasme ovocytaire, provenant d'un individu tiers. En effet, l'hétéroplasmie mitochondriale, même neutre, altérerait les fonctions physiologiques et cognitives chez la souris (Acton, 2007; Sharpley, 2012).

## **2) Cellules folliculeuses et qualité embryonnaire**

Les cellules folliculeuses, en raison des interactions étroites qu'elles établissent avec l'ovocyte au cours de la folliculogénèse sont des témoins de choix des événements présidant à l'acquisition de la compétence ovocytaire au cours de l'ovogénèse. La quantité d'ADNmt des cellules folliculeuses est corrélée avec la quantité d'ADNmt des ovocytes qu'elles entourent, montrant que le contenu de l'ovocyte en ADNmt est sous la dépendance de l'expression dans les cellules folliculeuses de certains gènes de la biogénèse mitochondriale (Boucret, 2015).

Des études préalables ont abordé le rôle de la qualité de l'ADNmt des cellules folliculeuses sur la qualité embryonnaire : le ratio de délétion d'ADNmt des cellules folliculeuses est lié négativement avec le taux de grossesse mais pas avec la qualité embryonnaire (Tsai, 2010). Nous nous sommes intéressés au versant quantitatif : nous avons trouvé un lien entre la quantité d'ADNmt des cellules folliculeuses et la qualité de l'embryon correspondant au deuxième jour de développement. Il semble qu'il puisse donc exister un lien entre la biogénèse mitochondriale au cours de la folliculogénèse et la qualité embryonnaire.

Ce lien entre le contenu moyen en ADNmt des cellules folliculeuses et la qualité embryonnaire, reflet de la compétence ovocytaire, permet d'envisager l'utilisation du taux moyen d'ADNmt des cellules folliculeuses comme nouveau marqueur indirect, non invasif, de la qualité embryonnaire.

Par ailleurs, en analyse multivariée, c'est à dire en prenant en compte l'influence des variables positives univariées ou décrites dans la littérature comme jouant un rôle dans la qualité embryonnaire, on confirme l'influence de l'âge maternel et la dose de FSH administrée sur la qualité embryonnaire. Cette influence, déjà décrite dans la littérature, peut servir de témoin de la qualité de nos propres résultats.

### **3) Cellules folliculeuses et critères de jugement secondaires**

Nous n'avons pas retrouvé de lien entre la quantité d'ADNmt et l'implantation embryonnaire. Compte tenu, d'une part, du petit nombre d'échantillons éligibles dans notre étude pour étudier cette relation et, d'autre part, du nombre important de facteurs de confusion tels que la réceptivité endométriale, une étude plus large semble nécessaire avant de conclure à l'absence de lien.

On pourrait, en outre, étudier l'intérêt du cumul des deux marqueurs (morphocinétique et quantité d'ADNmt des cellules folliculeuses) sur les chances d'implantation.

La maturité ovocytaire n'est pas liée avec la quantité d'ADNmt des cellules folliculeuses mais elle est liée à des facteurs rendant compte du taux d'immaturation d'une cohorte. Ainsi, la dose de FSH administrée, le type de protocole dépendent du profil ovarien des femmes traitées, lui-même en lien avec le taux d'immaturation de la cohorte ovocytaire chez ces femmes.

### **4) Facteurs de variation du taux d'ADNmt moyen des cellules folliculeuses**

Outre la qualité embryonnaire, on retrouve certains paramètres qui influent sur la quantité d'ADNmt des cellules folliculeuses. L'âge de la femme et l'exposition tabagique augmentent ce taux. Ces facteurs peuvent correspondre à des facteurs intrinsèques ou extrinsèques de stress énergétique susceptibles d'interférer pendant la croissance et la maturation ovocytaire. Il est possible qu'une quantité augmentée d'ADNmt soit un phénomène de compensation d'un stress des cellules folliculeuses et d'une altération de l'environnement folliculaire. Ainsi, l'augmentation compensatoire de la quantité d'ADNmt devient un facteur confondant, ce qui expliquerait pourquoi le lien entre ADNmt des cellules folliculeuses et qualité embryonnaire est plus visible chez les patientes non fumeuses que chez les fumeuses.

### **5) Conclusion**

Dans notre étude, la quantité d'ADNmt des cellules folliculeuses est liée avec la qualité embryonnaire (critère de jugement principal). Il semble cependant qu'il s'agisse d'un lien complexe sur lequel interviendraient de nombreux facteurs confondants (âge, exposition tabagique notamment).

Sous certaines conditions, en tenant compte des potentiels facteurs confondants, l'ADNmt pourrait être un marqueur indirect et non invasif de la qualité embryonnaire. D'autres études avec l'implantation comme critère de jugement principal seront nécessaires pour confirmer l'importance de l'ADNmt des cellules folliculeuses dans le développement embryonnaire afin d'en faire un marqueur, princeps ou additionnel, prédictif de grossesse et du taux de naissance vivante.

## **Abréviations :**

ADAMTS1 : A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif type 1  
ADNmt : Acide désoxyribonucléique mitochondrial  
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
ATP : Adénosine triphosphate  
 $\beta$ -hCG : Hormone chorionique gonadotrope  
BMI : Body Mass Index (Indice de masse corporelle)  
BMN : Blastomères multinuclés  
BMP 15: Bone morphogenetic protein 15  
CCO : Complexes cumulo-ovocytaires  
CF : Cellule(s) folliculeuse(s)  
CGH-array : Puces d'hybridation génomique comparative  
COX1 : Cytochrome c oxidase subunit 1  
Cox-2 : cyclo-oxygenase-2  
CV : Coefficient de variation  
DNC : Délai nécessaire à concevoir  
DOR: Diminished Ovarian Reserve  
DPC : Diagnostic pré-conceptionnel  
DPI : Diagnostic pré-implantatoire  
ESHRE : Société européenne de reproduction humaine et d'embryologie  
eSET: Elective single embryo transfer  
FIV : Fécondation in vitro  
G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor  
GDF 9: Growth differentiation factor 9  
GVBD: Rupture de la vésicule germinative  
Has-2 : Acide hyaluronique synthase-2  
ICSI : Intracytoplasmic sperm injection  
IIU : Insémination intra-utérine  
IMSI : Intracytoplasmic morphologically-selected sperm injection  
INSEE : Institut national de la statistique et des études économiques  
KL : Kit Ligand  
LH : Hormone lutéinisante  
LHR : récepteurs à la LH  
MAS : Stéroïdes activateurs de méiose  
MIV : Maturation in vitro  
MPF : M-Phase promoting factor  
NGS : Séquençage nouvelle génération  
OMI : Oocyte meiotic inhibitor  
OSF : Oocyte-secreted factors  
PR : Récepteurs à la progestérone  
ROS : Dérivés réactif de l'oxygène  
TFAM : Transcription Factor A Mitochondrial  
TGF-  $\beta$ : Transforming growth factor beta  
TLM : Time-lapse monitoring  
VEGF : Vascular endothelial growth factor



## **Références bibliographiques :**

- AbdelHafez, F. F., N. Desai, et al. (2010). "Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis." Reprod Biomed Online **20**(2): 209-22.
- Acton, B. M., I. Lai, et al. (2007). "Neutral mitochondrial heteroplasmy alters physiological function in mice." Biol Reprod **77**(3): 569-76.
- Adriaenssens, T., S. Wathlet, et al. (2010). "Cumulus cell gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics." Hum Reprod **25**(5): 1259-70.
- Agence de la biomédecine (2012). "Evaluation des résultats des centres d'AMP".
- Aitken, R. J. (1995). "Free radicals, lipid peroxidation and sperm function." Reprod Fertil Dev **7**(4): 659-68.
- Ambekar, A. S., D. S. Kelkar, et al. (2014). "Proteomics of follicular fluid from women with polycystic ovary syndrome suggests molecular defects in follicular development." J Clin Endocrinol Metab **100**(2): 744-53.
- Ambekar, A. S., R. S. Nirujogi, et al. (2013). "Proteomic analysis of human follicular fluid: a new perspective towards understanding folliculogenesis." J Proteomics **87**: 68-77.
- Anderson, E. and D. F. Albertini (1976). "Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary." J Cell Biol **71**(2): 680-6.
- Anderson, S., A. T. Bankier, et al. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." Nature **290**(5806): 457-65.
- Armstrong, S., N. Arroll, et al. (2015). "Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction." Cochrane Database Syst Rev **2**: CD011320.
- Artini, P. G., C. Battaglia, et al. (1994). "Relationship between human oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors." Hum Reprod **9**(5): 902-6.
- Assou, S., T. Anahory, et al. (2006). "The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile." Hum Reprod **21**(7): 1705-19.
- Assou, S., D. Haouzi, et al. (2008). "A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study." Mol Hum Reprod **14**(12): 711-9.
- Attaran, M., E. Pasqualotto, et al. (2000). "The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization." Int J Fertil Womens Med **45**(5): 314-20.
- Au, H. K., T. S. Yeh, et al. (2005). "Abnormal mitochondrial structure in human unfertilized oocytes and arrested embryos." Ann N Y Acad Sci **1042**: 177-85.
- Balaban (2011). "The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting." Hum Reprod **26**(6): 1270-83.
- Barrientos, A., J. Casademont, et al. (1997). "Reduced steady-state levels of mitochondrial RNA and increased mitochondrial DNA amount in human brain with aging." Brain Res Mol Brain Res **52**(2): 284-9.
- Barritt, J., S. Willadsen, et al. (2001). "Cytoplasmic transfer in assisted reproduction." Hum Reprod Update **7**(4): 428-35.
- Barritt, J. A., C. A. Brenner, et al. (2001). "Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation." Hum Reprod **16**(3): 513-6.
- Barritt, J. A., J. Cohen, et al. (2000). "Mitochondrial DNA point mutation in human oocytes is associated with maternal age." Reprod Biomed Online **1**(3): 96-100.
- Barritt, J. A., M. Kokot, et al. (2002). "Quantification of human ooplasmic mitochondria." Reprod Biomed Online **4**(3): 243-7.

- Basuray, R., R. G. Rawlins, et al. (1988). "High progesterone/estradiol ratio in follicular fluid at oocyte aspiration for in vitro fertilization as a predictor of possible pregnancy." Fertil Steril **49**(6): 1007-11.
- Bedaiwy, M., A. Y. Shahin, et al. (2007). "Differential expression of follicular fluid cytokines: relationship to subsequent pregnancy in IVF cycles." Reprod Biomed Online **15**(3): 321-5.
- Bentov, Y., N. Esfandiari, et al. (2013). "The use of mitochondrial nutrients to improve the outcome of infertility treatment in older patients." Fertil Steril **93**(1): 272-5.
- Boucret, L., J. M. Chao de la Barca, et al. (2015). "Relationship between diminished ovarian reserve and mitochondrial biogenesis in cumulus cells." Hum Reprod **30**(7): 1653-64.
- Braude, P., V. Bolton, et al. (1988). "Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development." Nature **332**(6163): 459-61.
- Bromer, J. G. and E. Seli (2008). "Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics." Curr Opin Obstet Gynecol **20**(3): 234-41.
- Buccione, R., A. C. Schroeder, et al. (1990). "Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis." Biol Reprod **43**(4): 543-7.
- Chan, C. C., V. W. Liu, et al. (2005). "Mitochondrial DNA content and 4977 bp deletion in unfertilized oocytes." Mol Hum Reprod **11**(12): 843-6.
- Chang, C. L., T. H. Wang, et al. (2002). "The concentration of inhibin B in follicular fluid: relation to oocyte maturation and embryo development." Hum Reprod **17**(7): 1724-8.
- Chappel, S. (2013). "The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst." Obstet Gynecol Int **2013**: 183024.
- Cillo, F., T. A. Brevini, et al. (2007). "Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes." Reproduction **134**(5): 645-50.
- Cohen, J., R. Scott, et al. (1997). "Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs." Lancet **350**(9072): 186-7.
- Cotterill, M., S. E. Harris, et al. (2013). "The activity and copy number of mitochondrial DNA in ovine oocytes throughout oogenesis in vivo and during oocyte maturation in vitro." Mol Hum Reprod **19**(7): 444-50.
- Cupisti, S., R. Dittrich, et al. (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**(12): 604-8.
- Dale, B., M. Wilding, et al. (2001). "Pregnancy after cytoplasmic transfer in a couple suffering from idiopathic infertility: case report." Hum Reprod **16**(7): 1469-72.
- de Boer KA, Jansen RP, Leigh DA, Mortimer D (1999). "Quantification of mtDNA copy number in the human secondary oocyte". Hum Reprod; **14**:91–2. 26.
- de Mouzon, J., V. Goossens, et al. (2010). "Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE." Hum Reprod **25**(8): 1851-62.
- De Placido, G., C. Alviggi, et al. (2006). "Intra-follicular leptin concentration as a predictive factor for in vitro oocyte fertilization in assisted reproductive techniques." J Endocrinol Invest **29**(8): 719-26.
- Debrock, S., K. Peeraer, et al. (2015). "Vitrification of cleavage stage day 3 embryos results in higher live birth rates than conventional slow freezing: a RCT." Hum Reprod **30**(8): 1820-30.
- Di Pasquale, E., P. Beck-Peccoz, et al. (2004). "Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene." Am J Hum Genet **75**(1): 106-11.

- Diaz, F. J., K. Wigglesworth, et al. (2007). "Oocytes are required for the preantral granulosa cell to cumulus cell transition in mice." *Dev Biol* **305**(1): 300-11.
- Diez-Juan, A., C. Rubio, et al. (2015). "Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: less is better." *Fertil Steril* **104**(3): 534-541 e1.
- DiMauro, S. and E. A. Schon (2003). "Mitochondrial respiratory-chain diseases." *N Engl J Med* **348**(26): 2656-68.
- Dominguez, F., M. Meseguer, et al. (2015). "New strategy for diagnosing embryo implantation potential by combining proteomics and time-lapse technologies." *Fertil Steril*.
- Dumesic, D. A., D. R. Meldrum, et al. (2015). "Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health." *Fertil Steril* **103**(2): 303-16.
- Dumollard, R., M. Duchen, et al. (2007). "The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo." *Curr Top Dev Biol* **77**: 21-49.
- Ebert, K. M., H. Liem, et al. (1988). "Mitochondrial DNA in the mouse preimplantation embryo." *J Reprod Fertil* **82**(1): 145-9.
- Edgar, D. H. and D. A. Gook (2012). "A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos." *Hum Reprod Update* **18**(5): 536-54.
- El Shourbagy, S. H., E. C. Spikings, et al. (2006). "Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig." *Reproduction* **131**(2): 233-45.
- El-Sayed, A., M. Hoelker, et al. (2006). "Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients." *Physiol Genomics* **28**(1): 84-96.
- Enien, W. M., S. el Sahwy, et al. (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**(11): 2840-4.
- Feldmann, G., J. L. Benifla, et al. (2006). "Apoptosis of granulosa cells as a predictive marker of in vitro fertilization success?" *Gynecol Obstet Fertil* **34**(7-8): 574-82.
- Feuerstein, P., V. Puard, et al. (2012). "Genomic assessment of human cumulus cell marker genes as predictors of oocyte developmental competence: impact of various experimental factors." *PLoS One* **7**(7): e40449.
- Fiorentino, F., S. Bono, et al. (2014). "Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles." *Hum Reprod* **29**(12): 2802-13.
- Fragouli, E., K. Spath, et al. (2015). "Altered levels of mitochondrial DNA are associated with female age, aneuploidy, and provide an independent measure of embryonic implantation potential." *PLoS Genet* **11**(6): e1005241.
- Gardner, D. K., M. Lane, et al. (2001). "Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential." *Fertil Steril* **76**(6): 1175-80.
- Gasca, S., F. Pellestor, et al. (2007). "Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach." *Reprod Biomed Online* **14**(2): 175-83.
- Ghanem, N., D. Salilew-Wondim, et al. (2011). "Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments." *Reproduction* **142**(4): 551-64.
- Gilchrist, R. B., M. Lane, et al. (2008). "Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality." *Hum Reprod Update* **14**(2): 159-77.
- Gilchrist, R. B., L. J. Ritter, et al. (2004). "Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals." *Anim Reprod Sci* **82-83**: 431-46.

- Gosden, R. and B. Lee (2010). "Portrait of an oocyte: our obscure origin." J Clin Invest **120**(4): 973-83.
- Gougeon, A. (1986). "Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results." Hum Reprod **1**(2): 81-7.
- Hamel, M., I. Dufort, et al. (2008). "Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes." Hum Reprod **23**(5): 1118-27.
- Hammond, E. R., B. Stewart, et al. (2015). "Assessing embryo quality by combining non-invasive markers: early time-lapse parameters reflect gene expression in associated cumulus cells." Hum Reprod **30**(8): 1850-60.
- Hsu, A. L., P. M. Townsend, et al. (2015). "Endometriosis may be associated with mitochondrial dysfunction in cumulus cells from subjects undergoing in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection, as reflected by decreased adenosine triphosphate production." Fertil Steril **103**(2): 347-52 e1.
- Huang, C. C., T. C. Cheng, et al. (1999). "Birth after the injection of sperm and the cytoplasm of tripronucleate zygotes into metaphase II oocytes in patients with repeated implantation failure after assisted fertilization procedures." Fertil Steril **72**(4): 702-6.
- Hussein, T. S., D. A. Froiland, et al. (2005). "Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins." J Cell Sci **118**(Pt 22): 5257-68.
- Hutt, K. J., E. A. McLaughlin, et al. (2006). "Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis." Mol Hum Reprod **12**(2): 61-9.
- Ishihara, O., G. D. Adamson, et al. (2015). "International committee for monitoring assisted reproductive technologies: world report on assisted reproductive technologies, 2007." Fertil Steril **103**(2): 402-13 e11.
- Jansen, R. P. and K. de Boer (1998). "The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate." Mol Cell Endocrinol **145**(1-2): 81-8.
- Jarkovska, K., H. Kupcova Skalnikova, et al. (2011). "Development of ovarian hyperstimulation syndrome: interrogation of key proteins and biological processes in human follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization." Mol Hum Reprod **17**(11): 679-92.
- Jones, G. M., D. S. Cram, et al. (2008). "Novel strategy with potential to identify developmentally competent IVF blastocysts." Hum Reprod **23**(8): 1748-59.
- Kameyama, Y., F. Fillion, et al. (2007). "Characterization of mitochondrial replication and transcription control during rat early development in vivo and in vitro." Reproduction **133**(2): 423-32.
- Kaser, D. J. and C. Racowsky (2014). "Reply: Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review." Hum Reprod Update **21**(1): 154.
- Katz-Jaffe, M. G., W. B. Schoolcraft, et al. (2006). "Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos." Fertil Steril **86**(3): 678-85.
- Kirkegaard, K., P. Villesen, et al. (2015). "Distinct differences in global gene expression profiles in non-implanted blastocysts and blastocysts resulting in live birth." Gene **571**(2): 212-20.
- Kolibianakis, E. M., C. A. Venetis, et al. (2009). "Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better?" Curr Opin Obstet Gynecol **21**(3): 270-4.
- Kopsidas, G., S. A. Kovalenko, et al. (2000). "Tissue mitochondrial DNA changes. A stochastic system." Ann N Y Acad Sci **908**: 226-43.

- Lanzendorf, S. E., J. F. Mayer, et al. (1999). "Pregnancy following transfer of ooplasm from cryopreserved-thawed donor oocytes into recipient oocytes." Fertil Steril **71**(3): 575-7.
- Larsen, W. J. and S. E. Wert (1988). "Roles of cell junctions in gametogenesis and in early embryonic development." Tissue Cell **20**(6): 809-48.
- Larsson, N. G., J. Wang, et al. (1998). "Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice." Nat Genet **18**(3): 231-6.
- Ledee, N., C. Munaut, et al. (2010). "Performance evaluation of microbead and ELISA assays for follicular G-CSF: a non-invasive biomarker of oocyte developmental competence for embryo implantation." J Reprod Immunol **86**(2): 126-32.
- Ledee, N., M. Petitbarat, et al. (2011). "New pre-conception immune biomarkers for clinical practice: interleukin-18, interleukin-15 and TWEAK on the endometrial side, G-CSF on the follicular side." J Reprod Immunol **88**(2): 118-23.
- Ledee, N., V. Gridelet, et al. (2013). "Impact of follicular G-CSF quantification on subsequent embryo transfer decisions: a proof of concept study." Hum Reprod **28**(2): 406-13.
- Lee, K. S., B. S. Joo, et al. (2001). "Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET." J Assist Reprod Genet **18**(9): 490-8.
- Leese, J., J. Conaghan et al. (1993) "Early human embryo metabolism". Bioessays. 15(4):259-64
- Levy, R., Y. Menezo (2003). "Cytoplasmic transfer: the risks?" in Proceedings of the 4th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology and Infertility, pp. 15–424, Berlin, Germany.
- Li, R. and D. F. Albertini (2013). "The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(3): 141-52.
- Lo Turco, E. G., F. B. Cordeiro, et al. (2013). "Proteomic analysis of follicular fluid from women with and without endometriosis: new therapeutic targets and biomarkers." Mol Reprod Dev **80**(6): 441-50.
- Loutradi, K. E., E. M. Kolibianakis, et al. (2008). "Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis." Fertil Steril **90**(1): 186-93.
- Mahrous, E., Q. Yang, et al. (2012). "Regulation of mitochondrial DNA accumulation during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse." Reproduction **144**(2): 177-85.
- Mantzoros, C. S., D. W. Cramer, et al. (2000). "Predictive value of serum and follicular fluid leptin concentrations during assisted reproductive cycles in normal women and in women with the polycystic ovarian syndrome." Hum Reprod **15**(3): 539-44.
- May-Panloup, P., M. F. Chretien, et al. (2005). "Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency." Hum Reprod **20**(3): 593-7.
- May-Panloup, P., M. F. Chretien, et al. (2007). "Mitochondrial DNA in the oocyte and the developing embryo." Curr Top Dev Biol **77**: 51-83.
- May-Panloup, P., V. Ferre-L'Hotellier, et al. (2012). "Molecular characterization of corona radiata cells from patients with diminished ovarian reserve using microarray and microfluidic-based gene expression profiling." Hum Reprod **27**(3): 829-43.
- McKenzie, L. J., S. A. Pangas, et al. (2004). "Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF." Hum Reprod **19**(12): 2869-74.
- Mendoza, C., E. Ruiz-Requena, et al. (2002). "Follicular fluid markers of oocyte developmental potential." Hum Reprod **17**(4): 1017-22.
- Meseguer, M., I. Rubio, et al. (2012). "Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study." Fertil Steril **98**(6): 1481-9 e10.

- Milewski, R., P. Kuc, et al. (2015). "A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development." J Assist Reprod Genet **32**(4): 571-9.
- Motta, P. M., S. A. Nottola, et al. (2000). "Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells." Hum Reprod **15 Suppl 2**: 129-47.
- Ouandaogo, Z. G., D. Haouzi, et al. (2011). "Human cumulus cells molecular signature in relation to oocyte nuclear maturity stage." PLoS One **6**(11): e27179.
- Nagai, S., T. Mabuchi, et al. (2004). "Oocyte mitochondria: strategies to improve embryogenesis." Hum Cell **17**(4): 195-201.
- Nygren, K. G., E. Sullivan, et al. (2012). "International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) world report: assisted reproductive technology 2003." Fertil Steril **95**(7): 2209-22, 2222 e1-17.
- Parinaud, J., L. Bujan. Formation des ovocytes et ovulation (2013). <http://www.chu-toulouse.fr/formation-des-ovocytes-et>
- Parks, J. C., B. R. McCallie, et al. (2011). "Blastocyst gene expression correlates with implantation potential." Fertil Steril **95**(4): 1367-72.
- Patrizio, P. and D. Sakkas (2009). "From oocyte to baby: a clinical evaluation of the biological efficiency of in vitro fertilization." Fertil Steril **91**(4): 1061-6.
- Pasqualotto, E. B., A. Agarwal, et al. (2004). "Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures." Fertil Steril **81**(4): 973-6.
- Perreault, S. D., R. R. Barbee, et al. (1988). "Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes." Dev Biol **125**(1): 181-6.
- Perez, G. I., A. M. Trbovich, et al. (2000). "Mitochondria and the death of oocytes." Nature **403**(6769): 500-1.
- Piko, L. and K. D. Taylor (1987). "Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos." Dev Biol **123**(2): 364-74.
- Poulton, J., V. Macaulay, et al. (1998). "Mitochondrial genetics : is the bottleneck cracked?" Am J Hum Genet **62**(4): 752-7.
- Regiani, T., F. B. Cordeiro, et al. (2015). "Follicular fluid alterations in endometriosis: label-free proteomics by MS(E) as a functional tool for endometriosis." Syst Biol Reprod Med **61**(5): 263-76.
- Reinthaller, A., J. Deutinger, et al. (1987). "Relationship between the steroid and prolactin concentration in follicular fluid and the maturation and fertilization of human oocytes". J In Vitro Fert Embryo Transf **4**:228–31
- Reynier, P., P. May-Panloup, et al. (2001). "Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes." Mol Hum Reprod **7**(5): 425-9.
- Santos, T. A., S. El Shourbagy, et al. (2006). "Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome." Fertil Steril **85**(3): 584-91.
- Sarapik, A., A. Velthut, et al. (2012). "Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success." Clin Dev Immunol **2012**: 606459.
- Savchev, S. I., V. A. Moragianni, et al. (2010). "Follicular fluid-specific distribution of vascular endothelial growth factor isoforms and sFlt-1 in patients undergoing IVF and their correlation with treatment outcomes." Reprod Sci **17**(11): 1036-42.
- Seli, E., CG. Vergouw, et al. (2010). "Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for non-invasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer". Fertil Steril **94**: 535-542.
- Sharpley, M. S., C. Marciniak, et al. (2012). "Heteroplasmy of mouse mtDNA is genetically unstable and results in altered behavior and cognition." Cell **151**(2): 333-43.

- Siristatidis, C., M. Aggeliki Komitopoulou et al. (2015) "Morphokinetic parameters of early embryo development via time lapse monitoring and their effect on embryo selection and ICSI outcomes: a prospective cohort study". *J Assist Reprod Genet* 32(4):563-70
- Skiadas, C. C., S. Duan, et al. (2012). "Ovarian reserve status in young women is associated with altered gene expression in membrana granulosa cells." *Mol Hum Reprod* 18(7): 362-71.
- Sobinoff, A. P., E. L. Beckett, et al. (2013). "Scrambled and fried: cigarette smoke exposure causes antral follicle destruction and oocyte dysfunction through oxidative stress." *Toxicol Appl Pharmacol* 271(2): 156-67.
- Soyal, S. M., A. Amleh, et al. (2000). "FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation." *Development* 127(21): 4645-54.
- Spira, A., C. Persoz. (2012). "INSERM : les troubles de la fertilité - état des connaissances et pistes pour la recherche".
- St John, J. (2013). "The control of mtDNA replication during differentiation and development." *Biochim Biophys Acta* 1840(4): 1345-54.
- St John, JC., J. Facucho-Oliveira et al. (2010). Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells". *Hum Reprod Update*. 16(5):488-509.
- Steuerwald, N., J. A. Barritt, et al. (2000). "Quantification of mtDNA in single oocytes, polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR." *Zygote* 8(3): 209-15.
- Stigliani, S., L. Persico, et al. (2014). "Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome." *Mol Hum Reprod* 20(12): 1238-46.
- Stojkovic, M., S. A. Machado, et al. (2001). "Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture." *Biol Reprod* 64(3): 904-9.
- Sugiura, K., F. L. Pendola, et al. (2005). "Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism." *Dev Biol* 279(1): 20-30.
- Sugiyama, R., A. Fuzitou, et al. (2010). "Bone morphogenetic protein 2 may be a good predictor of success in oocyte fertilization during assisted reproductive technology." *Hum Cell* 23(3): 83-8.
- Sunderam, S., DM. Kissin et al. (2015). " Assisted Reproductive Technology Surveillance - United States, 2012". *MMWR Surveill Summ*. 64 Suppl 6:1-29
- Thibault, C., M-C. Lévassieur (2001). "La reproduction chez les mammifères et l'homme". Quae ed: Ellipses; Paris, 928.
- Thompson, W. E., J. Ramalho-Santos, et al. (2003). "Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control." *Biol Reprod* 69(1): 254-60.
- Thonneau, P., S. Marchand et al. (1991). "Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions". *Hum Reprod*; 6: 811-816.
- Thundathil, J., F. Filion, et al. (2005). "Molecular control of mitochondrial function in preimplantation mouse embryos." *Mol Reprod Dev* 71(4): 405-13.
- Tilly, J. L. (2001). "Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(11): 838-48.
- Tingen, C., A. Kim, et al. (2009). "The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries." *Mol Hum Reprod* 15(12): 795-803.
- Toescu, E. C., N. Myronova, et al. (2000). "Age-related structural and functional changes of brain mitochondria." *Cell Calcium* 28(5-6): 329-38.

- Torrioni, A., K. Huoponen, et al. (1996). "Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations." *Genetics* **144**(4): 1835-50.
- Trounce, I., E. Byrne, et al. (1989). "Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing." *Lancet* **1**(8639): 637-9.
- Tsai, H. D., Y. Y. Hsieh, et al. (2010). "Mitochondria DNA deletion and copy numbers of cumulus cells associated with in vitro fertilization outcomes." *J Reprod Med* **55**(11-12): 491-7.
- Unger, V. M., N. M. Kumar, et al. (1999). "Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel." *Science* **283**(5405): 1176-80.
- Uyar, A., S. Torrealday, et al. (2013). "Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality." *Fertil Steril* **99**(4): 979-97.
- Van Blerkom, J. et al. (2011). "Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence." *Mitochondrion* **11**(5):797-813
- Van Blerkom, J. and P. Davis (2007). "Mitochondrial signaling and fertilization." *Mol Hum Reprod* **13**(11): 759-70.
- Van Blerkom, J., P. W. Davis, et al. (1995). "ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer." *Hum Reprod* **10**(2): 415-24.
- Van Blerkom, J., J. Sinclair, et al. (1998). "Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy." *Hum Reprod* **13**(10): 2857-68.
- Van Montfoort, A. P., J. P. Geraedts, et al. (2008). "Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis." *Mol Hum Reprod* **14**(3): 157-68.
- Vassena, R., S. Boue, et al. (2011). "Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development." *Development* **138**(17): 3699-709.
- Wai, T., D. Teoli, et al. (2008). "The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes." *Nat Genet* **40**(12): 1484-8.
- Wallace, M., et al. (2012). "An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome." *Fertil Steril* **97**(5):1078-84.e1-8
- Wang, Q., A. I. Frolova, et al. (2010). "Mitochondrial dysfunction and apoptosis in cumulus cells of type I diabetic mice." *PLoS One* **5**(12): e15901.
- Wang, Q., A. M. Ratchford, et al. (2009). "Maternal diabetes causes mitochondrial dysfunction and meiotic defects in murine oocytes." *Mol Endocrinol* **23**(10): 1603-12.
- Wang, TH., CL. Chang, et al. (2006). "Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development". *Fertil Steril*; **86**:1392-401.
- Wathlet, S., T. Adriaenssens, et al. (2011). "Cumulus cell gene expression predicts better cleavage-stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients." *Hum Reprod* **26**(5): 1035-51.
- Wu, L. M., M. H. Hu, et al. (2012). "Chronic unpredictable stress decreases expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mouse ovaries: relationship to oocytes developmental potential." *PLoS One* **7**(12): e52331.
- Wu, Y. T., L. Tang, et al. (2007). "High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development." *Hum Reprod* **22**(6): 1526-31.
- Zamah, A. M., M. E. Hassis, et al. (2015). "Proteomic analysis of human follicular fluid from fertile women." *Clin Proteomics* **12**(1): 5.



Zeng, H. T., Z. Ren, et al. (2007). "Low mitochondrial DNA and ATP contents contribute to the absence of birefringent spindle imaged with PolScope in in vitro matured human oocytes." Hum Reprod **22**(6): 1681-6.

### **Liste des figures :**

- Figure 1 : Part des enfants nés après AMP en 2012 selon le type d'AMP et l'origine des gamètes (données : agence de la biomédecine).
- Figure 2 : Interaction bidirectionnelle entre l'ovocyte et les cellules environnantes (Li, 2013).
- Figure 3 : Schéma général de l'ovogenèse (Parinaud, 2013).
- Figure 4 : Représentation des différents stades de la folliculogenèse (Gosden, 2010)
- Figure 5 : Folliculogenèse, ovogenèse et cycle ovarien
- Figure 6 : Organisation schématique d'une mitochondrie
- Figure 7 : Génome mitochondrial humain (Anderson, 1981)
- Figure 8 : Goulot d'étranglement génétique mitochondrial (Poulton, 1998).
- Figure 9 : Evolution du taux d'ADN mitochondrial pendant l'ovogenèse et l'embryogenèse précoce (St John, 2010)
- Figure 10 : protocole d'extraction de l'ADN avec le kit NucleoSpin® Tissue de Macherey-Nagel
- Figure 11 : Diagramme de flux de la population
- Figure 12 : Quantité d'ADNmt des cellules folliculeuses (CF) en fonction de la qualité embryonnaire.
- Figure 13 : Quantité d'ADNmt des cellules folliculeuses (CF) en fonction de l'exposition tabagique féminine.
- Figure 14 : Quantité d'ADNmt des cellules folliculeuses (CF) chez les patientes non fumeuses en fonction de la qualité embryonnaire.

### **Liste des tableaux :**

- Tableau I: Evolution de l'activité globale d'AMP entre 2009 et 2012 (données : agence de la biomédecine).
- Tableau II : Classification de la qualité embryonnaire selon leur morphologie au stade clivé J2.
- Tableau III : Influence des différents paramètres de la tentative sur les critères de jugements (analyse univariée).
- Tableau IV : Influence des différents paramètres de la tentative sur les critères de jugements (analyse multivariée).
- Tableau V : Paramètres liées à la qualité embryonnaire en analyse multivariée
- Tableau VI : Maturité ovocytaire en fonction du BMI moyen
- Tableau VII : Maturité ovocytaire en fonction du type de stimulation administrée
- Tableau VIII : Influence des différents paramètres de la tentative sur la quantité d'ADNmt (analyse univariée).
- Tableau IX : Influence des différents paramètres de la tentative sur la quantité d'ADNmt (analyse multivariée).
- Tableau X : Influence des paramètres spermatiques sur les critères de jugements (analyse univariée).

## Table des matières :

### Introduction

#### A – Assistance médicale à la procréation (AMP)

##### 1) Epidémiologie de la fertilité:

##### 2) Résultats actuels en AMP

##### 3) Pistes d'amélioration

##### d- Système time lapse monitoring (TLM)

##### e- Omiques

b1/ Transcriptomique

b2/ Protéomique

b3/ Métabolomique

##### f- Cytokines et facteurs de croissance

##### g- Analyse du microenvironnement folliculaire

#### B- Ovocyte et microenvironnement folliculaire

##### 1) Ovogenèse

##### 2) Folliculogenèse

##### a- Différents types histologiques de follicules

##### b- Chronologie

##### 3) Communication bidirectionnelle ovocyte/cumulus

##### a- Jonctions communicantes

##### b- Signaux paracrines

#### C- Mitochondrie et qualité ovocytaire/embryonnaire

##### 1) Généralités sur la mitochondrie et l'ADN mitochondrial

##### 2) Transmission maternelle à l'embryon

##### 3) Rôles de la mitochondrie dans l'ovogenèse et l'embryogenèse

##### a- Ovogenèse

##### b- Embryogenèse

#### D- Cellules folliculeuses et qualité ovocytaire / embryonnaire ?

### Objectif de l'étude

### Matériels & Méthodes

#### A- Patients

##### 1) Description de la population

##### 2) Recrutement

##### 3) Critères de sélection

#### B- Collection échantillons

#### C- Extraction ADN mitochondrial

#### D- Quantification de l'ADN mitochondrial

#### E- Critères de jugement

##### 1) Critère de jugement principal : qualité embryonnaire

##### 2) Critères de jugement secondaires

##### a- Maturité ovocytaire

##### b- Evolutivité embryonnaire

##### c- Implantation embryonnaire

#### F- Statistiques

## Résultats

### A- Caractéristiques de la population

### B- Echantillons et quantification de l'ADN mitochondrial

### C- Critère de jugement principal : qualité embryonnaire et ADNmt

#### 1) Analyse univariée

#### 2) Analyse multivariée

### D- Critères de jugement secondaires

#### 1) Analyse univariée

a- Maturité embryonnaire

b- Evolutivité et implantation embryonnaire

#### 2) Analyse multivariée

a- Maturité ovocytaire

b- Evolutivité et implantation embryonnaire

### E- ADN mitochondrial

#### 1) Analyse univariée

#### 2) Analyse multivariée

### F- Paramètres spermatiques

## Discussion

### A- Biais et analyse critique des méthodes

### B- Présentation des résultats et comparaison avec d'autres travaux.

#### 1) Mitochondrie et qualité embryonnaire

#### 2) Cellules folliculeuses et qualité embryonnaire

#### 3) Cellules folliculeuses et critères de jugement secondaires

#### 4) Facteurs de variation du taux d'ADNmt moyen des cellules folliculeuses

#### 5) Conclusion