



Biomarqueurs de la réceptivité endométriale humaine : du fondamental aux applications cliniques

Laurence Bissonnette

► To cite this version:

Laurence Bissonnette. Biomarqueurs de la réceptivité endométriale humaine : du fondamental aux applications cliniques. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONTT017 . tel-01342120

HAL Id: tel-01342120

<https://theses.hal.science/tel-01342120>

Submitted on 5 Jul 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivrée par **UNIVERSITE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale des Sciences
Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)
Et de l'unité de recherche U1203 Développement
embryonnaire précoce humain et pluripotence

Spécialité : **Reproduction humaine**

Présentée par **Laurence BISSONNETTE**

**BIO-MARQUEURS DE LA RÉCEPTIVITÉ
ENDOMÉTRIALE HUMAINE : DU FONDAMENTAL
AUX APPLICATIONS CLINIQUES**

Soutenue le 16 novembre 2015 devant le jury composé de



Dr. Paul BARRIERE, PUPH, CHU Nantes
Dr. Catherine Jan BRENNER, DR2, Université Paris-Sud
Pr. Samir HAMAMAH, PUPH, Université de Montpellier
Dr. Delphine HAOUZI, IH, IRMB, CHRU Montpellier
Dr. Marie-Luce VIGNAIS, CR1, IRMB, CHRU Montpellier
Dr. Isaac-Jacques KADOCH, Professeur agrégé,
Université de Montréal

Président du jury
Rapporteur
Directeur
Co-encadrant
Invité
Invité

Remerciements

Je tiens à remercier tous les gens qui m'ont épaulée et ont rendu possible cette thèse.

Dans un premier temps, je remercie mon directeur de thèse, Pr. Samir Hamamah, qui m'a donné la possibilité d'étudier le processus d'acquisition de la réceptivité endométriale. Je le remercie pour les conseils judicieux. Je suis reconnaissante envers Dr. Delphine Haouzi, ma co-encadrante de thèse, pour son accueil chaleureux, sa disponibilité, ses connaissances et ses encouragements. Merci d'avoir affiché mon western blot dans ton bureau.

Je remercie les membres du jury Dr. Paul Barriere, Catherine Brenner et Marie-Luce Vignais d'avoir accepté et pris le temps d'évaluer mon travail et de partager leurs expertises.

Ce projet n'aurait pas été possible sans la clinique OVO, principalement Dr. I.J. Kadoch et Dr. F. Bissonnette. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez donnée. Merci aux membres du département de Recherche & Développement OVO pour le merveilleux travail qu'ils ont accompli : Cécile Le Saint, Shirley Brugerie, Marie-Paule Lachambre, Cynthia Lévesque, Sandra Bisotto, Marie-Claude Lacoste, Amélie Bourdieu, Sophie Leblanc, Nelly Delouya et Aissatou Fall. Merci aux membres du département d'embryologie pour leur soutien, spécialement à Evelyne Boulet pour les photos d'embryons, Elise Mondou et Virginie Lafontaine pour les re-lectures. Je remercie les médecins de OVO fertilité d'avoir recruté les patientes et complété les biopsies nécessaires pour ce projet.

Je souhaite remercier la direction et l'ensemble des membres de l'IRMB qui ont su créer un environnement agréable de travail. Et plus particulièrement aux membres de mon unité de recherche pour avoir partagé le travail quotidien. Je tiens à remercier spécialement Yannick Antoine, Loubna Drissenek, Sabine Traver et Cécile Monzo. J'aimerais remercier la plateforme de protéomique clinique de l'IRMB, particulièrement Christophe Hirtz, pour son aide et ses explications. Je remercie par ailleurs tous les collaborateurs de ce présent projet (Dr. J. Faidherbe, Dr. F. Paris et Dr. H. Perrochia). Merci à la direction ainsi que l'équipe du département d'AMP de l'hôpital Arnaud de Villeneuve.

Un merci spécial aux personnes qui ont partagé ma vie pendant mon séjour à Montpellier, rendant ces années inoubliables: merci Audrey, Marion, Anne-Laure, Matthieu, Amélie, Naomi. Finalement, un grand merci à mon conjoint Vincent, mes parents, mes sœurs, mes frères et mes proches qui ont su m'écouter, m'encourager et me changer les idées.

Résumé

L'acquisition du phénotype de la réceptivité endométriale est une étape clé de l'implantation embryonnaire. Dans ce contexte, ce projet vise à mieux cerner les mécanismes moléculaires de la réceptivité endométriale. Des approches globales (transcriptome et protéome), ont été utilisées pour nos activités de recherche et le développement d'outils diagnostiques en AMP.

Nous avons déterminé les fonctions d'un de nos bio-marqueurs de la réceptivité endométriale par shARNs, S100A10. L'extinction de S100A10 dans les cellules primaires endométriales affecte la migration, la décidualisation et l'apoptose des cellules endométriales, des fonctions biologiques majeures impliquées dans le processus d'implantation. D'autre part, nous avons implanté notre test d'appréciation de la réceptivité endométriale dans une clinique de fertilité à Montréal et initié une étude prospective clinique de l'évaluation de la réceptivité endométriale en cycle naturel de patientes en attente d'une procédure de FIV/ICSI. De plus, nous avons démontré un effet délétère d'une progestéronémie élevée le jour du déclenchement de l'ovulation sous traitement de stimulation ovarienne sur la transition des profils transcriptomiques des endomètres pré-réceptifs et réceptifs, suggérant une accélération de la maturation endométriale pendant la phase péri-ovulatoire, sans pour autant affecter la réceptivité endométriale. Enfin, nous avons montré que la réceptivité endométriale des patientes sous traitements hormonaux substitutifs différait de celles en cycle naturel, caractérisée par une altération des voies de signalisation médiée par les récepteurs aux œstrogènes, des membres de la famille VEGF et des intégrines.

Mots clés

Fertilité, Fécondation *In Vitro*, endomètre, réceptivité, implantation, grossesse

Biomarkers of endometrial receptivity: from fundamental to clinical applications

Abstract

The acquisition of the receptive endometrial phenotype is a key step of the embryo implantation. In this context, this project aims to better understand the molecular mechanisms of the endometrial receptivity. Global technologies (transcriptome and proteome) were used for our research and the development of diagnostics tools in assisted reproductive technologies.

We determined the functions of one of our endometrial receptivity biomarkers, S100A10, using shRNAs. S100A10 knockdown in primary endometrial cells affected migration, decidualization and apoptosis of endometrial cells, some major biological functions involved in the implantation process. Moreover, we established our test assessing endometrial receptivity in a fertility clinic in Montreal and initiated a prospective clinical study of the evaluation of endometrial receptivity in natural cycle of patients waiting for an ICSI/IVF attempt. Moreover, we demonstrated an alteration of the gene expression shift from the pre-receptive to the receptive stage of the endometrium of patients with elevated serum progesterone level on the day of ovulation induction, suggesting an accelerated endometrial maturation during the periovulation phase, and thus, without affecting the endometrial receptivity. Finally, we demonstrated that the endometrial receptivity of patients under hormone replacement therapy was different from patients in natural cycle, characterised by alternations in the signaling pathways mediated by the oestrogen receptor, VEGF family members and integrins.

Keys words

Fertility, *In Vitro* Fertilisation, endometrium, receptivity, implantation, pregnancy

Intitulé de l'équipe de recherche

U1203 Développement embryonnaire précoce humain et pluripotence

Institut de Médecine Régénératrice et Biothérapie (IRMB)

Hôpital Saint-Eloi

CHU Montpellier

80, av. Augustin Fliche

Table des matières

Remerciements	1
Résumé	2
Mots clés	2
Abstract	3
Keys words	3
Intitulé de l'équipe de recherche	4
Table des matières	5
Liste des tableaux.....	9
Liste des figures.....	11
Introduction générale	14
Chapitre 1 Introduction bibliographique.....	16
1. L'endomètre	16
1.1 Description morphologiques de l'endomètre	16
1.2 Le cycle menstruel	17
1.2.1 Phase menstruelle	17
1.2.2 Phase proliférative	18
1.2.3 Phase sécrétoire	18
1.3 La fenêtre d'implantation	19
2. L'implantation	19
2.1 Développement folliculaire et ovocytaire.....	19
2.1.1 Follicule primordial	19
2.1.2 La folliculogénèse	20
2.2 Le cycle ovarien	22

2.2.1	Phase folliculaire.....	22
2.2.2	Phase lutéale	23
2.3	Développement embryonnaire précoce	24
2.4	Préparation endométriale à l'implantation	25
2.4.1	Modifications morphologiques de l'épithélium luminal	25
2.4.2	Décidualisation	25
2.4.3	Invasion des cellules immunitaires	27
2.4.4	Mécanisme de remodelage et de dégradation de la MEC endométriale	28
2.5	Implantation embryonnaire.....	29
2.5.1	Phases de l'implantation.....	29
2.5.1.1	L'apposition	29
2.5.1.2	L'adhésion.....	30
2.5.1.3	L'invasion	30
2.5.2	Signaux embryonnaires	31
2.5.3	Réponse immunitaire à l'implantation	33
3.	Assistance médicale à la procréation	34
3.1	Stimulation ovarienne	34
3.2	Développement embryonnaire <i>in vitro</i>	34
3.3	Transfert embryonnaire.....	35
3.4	Cryo-préservation et traitement hormonal substitutif	36
4.	Réceptivité endométriale	37
4.1	Approches conventionnelles d'appréciation de la réceptivité endométriale	37
4.2	Bio-marqueurs de la réceptivité endométriale.....	38
4.2.1	Bio-marqueurs uniques	38
4.2.2	Technologies Omics	38

4.2.2.1	Transcriptome.....	39
4.2.2.2	Protéome	41
4.2.2.3	Comparaison des données transcriptomiques et protéomiques	42
4.3	Réceptivité endométriale et stimulation ovarienne	43
4.4	Tests diagnostiques de la réceptivité endométriale	44
4.4.1	Win-Test	44
4.4.2	Endometrial receptivity array	46
4.5	Test diagnostique du profil immunologique de l'endomètre	47
4.6	Transfert embryonnaire personnalisé	47
5.	Analyse fonctionnelle d'un bio-marqueur de la réceptivité endométriale	48
5.1	Famille S100	48
5.2	S100A10.....	49
5.2.1	Rôles de S100A10	50
5.2.1.1	Régulation de l'actine	50
5.2.1.2	Production de plasmine	50
5.2.1.3	Trafic de protéine	50
5.2.2	S100A10 en fertilité	51
6.	Contexte des problématiques abordées.....	51
Chapitre 2 Human S100A10 plays a crucial role in the acquisition of the endometrial receptivity phenotype.....		55
Chapitre 3 Implantation du Win-Test au sein de la clinique d'assistance médicale à la procréation 'OVO' à Montréal, Canada et étude prospective de la réceptivité endométriale de patientes en cycle naturel.....		106
Chapitre 4 Endometrial receptivity profile in patients with premature progesterone elevation on the day of HCG administration		115
Chapitre 5 Endometrial receptivity under hormone replacement therapy in oocyte-donation recipient patients: transcriptomic approach		125

Chapitre 6 Discussion générale et perspectives	148
Bibliographie	155
Annexe	172
Abréviations	172

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1 Liste des gènes sélectionnés.....	45
--	----

Chapitre 2

Table 1 Comparison of the study design of the current and previous mass spectrometry-based proteomic analyses of endometrial samples at different phases of the menstrual cycle	59
--	----

Table SI Summary of the proteins identified by LC-MS/MS	85
--	----

Table S2 List of genes that are differentially expressed in HEECs transduced with S100A10 shRNAs compared to control shRNA	97
---	----

Table S3 List of genes that are differentially expressed in HESCs transduced with S100A10 shRNAs compared to control shRNA	98
---	----

Table S4 DNA sequences of the three shRNAs targeting S100A10.....	105
--	-----

Table S5 Sequence of the primers used for RT-qPCR	105
--	-----

Chapitre 4

Table 1 Design of three microarray-based studies that investigated the impact of high serum progesterone level on the endometrial gene expression profile	117
--	-----

Table 2 Patients' clinical characteristics on the day of hCG administration and pregnancy outcome	118
--	-----

Table 3 List of genes shared by the normal serum [P] and high serum [P] groups.....	120
--	-----

Chapitre 5

Table 1 Clinical characteristics and outcomes of RIF patients.....	129
---	-----

Table 2 Genes associated with canonical signalling pathways that were specifically deregulated in HRT-treated oocyte-donation recipients compared to patients in spontaneous cycle	135
---	-----

Table 3 Results of the Win-Test® in each HRT-treated oocyte-donation recipient	138
---	-----

Table 4 Results of the Win-Test in each patient with repeated implantation failures139

Supplementary Table 1 Clinical characteristics and pregnancy outcome in oocyte-donation recipients.....147

Chapitre 6

Tableau 1 Gènes reliés à la polarité cellulaire, modulées dans les cellules shARN S100A10 épithéliales et stromales endométriales humaines, avec leur fonction respective153

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1 Folligullogénèse et enchaînement des rétroactions contrôlant la fonction ovarienne	21
Figure 2 Développement embryonnaire précoce.....	24
Figure 3 Décidualisation des cellules stromales endométriales	26
Figure 4 Phases de l'implantation embryonnaire humaine.....	29
Figure 5 Phases d'adhésion et d'invasion du trophoctoderme embryonnaire	31
Figure 6 Dialogue précoce entre les cellules du trophoctoderme embryonnaire et l'endomètre, lors de l'implantation	33
Figure 7 Étapes de la sélection des bio-marqueurs de la réceptivité endométriale.....	45

Chapitre 2

Figure 1 Study workflow: from proteomic pre-screening up to investigation of the function(s) of candidate proteins	60
Figure 2 S100A10 and S100A11 expression in endometrium samples from fertile women and patients with RIF	63
Figure 3 S100A10 protein expression in endometrial samples from fertile women and in primary endometrial cells.....	64
Figure 4 Functional analysis	66
Figure 5 Transcriptome analysis by DNA microarrays of HEECs and HESCs transduced with control shRNA or S100A10 shRNAs	69

Chapitre 3

Figure 1 Bilan des patientes recrutées pour le présent projet de recherche, selon que le monitoring du cycle naturel ait été effectué en suivi de la TBC ou par le dosage de la LH.....	107
Figure 2 Courbe de la TBC typique (mamanandco.fr).....	109
Figure 3 Prévalence du statut de la réceptivité selon le jour du prélèvement endométrial.....	110

Figure 4 Distribution du jour du prélèvement de l'endomètre chez les patientes diagnostiquées réceptives	111
---	-----

Chapitre 4

Figure 1 (a) Number of genes that were up- or downregulated in the normal and high [P] groups. (b) Venn diagram of the transcripts that were differentially expressed in the prereceptive endometrial samples from patients with normal or high serum [P]	118
--	-----

Figure 2 Signalling pathways that were altered in the high serum [P] group	119
---	-----

Figure 3 Validation by quantitative RT-PCR analysis of genes related to the cell cycle function modulated in the high [P] group. RNA isolated from hCG+2 and hCG+5 endometrial samples of normal and high serum [P] patients (n = 3/each group) was used	119
---	-----

Figure 4 Unsupervised hierarchical clustering of the prereceptive and receptive endometrium samples using the previously described predictor list. Comparaison of the gene expression profiles at hCG+2 and hCG+5 in the normal and high serum [P] groups revealed similar transcriptomic profiles	120
---	-----

Figure 5 Validation by quantitative RT-PCR analysis of several biomarkers of endometrial receptivity using RNA isolated from hCG+5 endometrial samples of normal and high serum [P] patients (n = 3/each group)	121
--	-----

Chapitre 5

Figure 1 Study design.	130
------------------------------------	-----

Figure 2 (A) Unsupervised classification with hierarchical clustering of 14 endometrium samples from patients in spontaneous cycles (LH+7, n=7) and recipient patients receiving HRT (Pg+5, n=7). (B) Number of genes that are differentially expressed during the peri-implantation period in the LH+7 and Pg+5 samples shown in A.	133
--	-----

Figure 3 Alteration of oestrogen receptor (ER) (A) and integrin (B) signalling during the implantation window in the endometrium of recipients patients receiving HRT compared to the endometrium of patients in spontaneous cycles (control). In this network, edge types are indicatives: a plain line indicates direct interactions, a dashed line indicates indirect interactions, a line without arrowhead indicates binding only, a line finishing with a vertical line indicates inhibition, a line with an arrowhead indicates «acts on»	134
---	-----

Figure 4 Analysis of the expression of endometrial receptivity biomarkers by RT-qPCR in Pg+5 endometrial samples from recipient patients receiving HRT..	136
--	-----

Figure 5 Distribution of receptive samples diagnosed by the Win-Test® results according to the HRT-cycle timing..... 138

Supplementary Figure 1 Validation by RT-qPCR of some genes encoding factors related to the signalling pathways the expression of which is altered in the endometrium of HRT-treated oocyte-donation recipients (Pg+5) compared to patients in spontaneous cycle (LH+7 samples) 147

Chapitre 6

Figure 1 Marquage immuno-fluorescent S100A10 152

Introduction générale

Selon la Société Européenne de Reproduction Humaine et d'Embryologie (ESHRE), l'infertilité affecte environ 15% de la population mondiale en âge de procréer. Ainsi, annuellement 1.5 million de cycles de fécondation *in vitro* (FIV) sont réalisés à travers le monde, et plus de 350 000 naissances vivantes en résultent (ESHRE, 2011). Bien que de nombreux progrès aient été accomplis au sein des laboratoires d'assistance médicale à la procréation (AMP), les taux de grossesse moyens par transfert embryonnaire sont de 32% (ESHRE, 2011). Ainsi, l'implantation embryonnaire est un facteur limitant de la réussite de l'AMP.

Pendant la majorité du cycle menstruel, l'endomètre est réfractaire à l'implantation embryonnaire hormis pendant une très courte période, appelée fenêtre d'implantation. Pendant cette période, l'endomètre acquiert un statut transitoire réceptif qui permet l'adhésion de l'embryon. Lors du processus d'implantation, en premier lieu l'embryon s'appose à la paroi maternelle selon une orientation précise, puis adhère à la muqueuse utérine avant de l'envahir. Une implantation réussie requiert non seulement un embryon compétent, mais aussi un endomètre réceptif ainsi qu'une synchronisation entre le degré de maturation du tissu maternel et le stade de développement de l'embryon. Cependant, les mécanismes moléculaires qui régissent la réceptivité endométriale humaine ne sont pas complètement élucidés. De plus, les options proposées à ce jour permettant d'apprécier la réceptivité endométriale dans un cadre clinique ne sont pas optimales. Dans ce contexte, la compréhension des mécanismes moléculaires de l'acquisition de la réceptivité endométriale, et le développement d'outils d'appréciation de la réceptivité endométriale revêtent donc d'une importance capitale qui devrait permettre d'améliorer les résultats en AMP.

L'une des thématiques de l'équipe 'Développement embryonnaire précoce humain et pluripotence', que j'ai rejoint en 2012, concerne la compréhension des mécanismes moléculaires d'acquisition du phénotype de la réceptivité endométriale. Des approches globales à haut débit de type transcriptome et protéome, ont été utilisées aussi bien pour leurs activités de recherche que pour le développement d'outils diagnostiques en AMP. En effet, ces approches, et en particulier le transcriptome, a permis à l'équipe d'identifier une signature spécifique de la réceptivité endométriale. De cette signature, un test d'appréciation de la réceptivité endométriale a été mis en place, appelé le 'Win-Test', basé sur l'analyse de l'expression d'un panel de gènes endométriaux extraits à partir d'une biopsie prélevée pendant la fenêtre théorique d'implantation en cycle naturel.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à divers aspects de la réceptivité endométriale. Ces aspects sont abordés sous quatre angles, explorant les problématiques suivantes :

- 1) Déterminer les fonctions d'un des bio-marqueurs de la réceptivité endométriale. Grâce aux données protéomiques et transcriptomiques, nous avons sélectionné un bio-marqueur de la réceptivité endométriale: la protéine S100A10. Nous avons effectué des analyses fonctionnelles afin de définir le rôle de S100A10 dans l'acquisition de la réceptivité endométriale et du processus d'implantation.
- 2) Mise en place d'une étude prospective du Win-Test en association avec une clinique d'AMP, OVO, à Montréal (Canada). Nous avons implanté la technologie du Win-Test au sein de cette clinique et initié une étude prospective sur l'évaluation du statut de l'endomètre pendant la fenêtre théorique d'implantation de patientes en cycle naturel en attente d'une procédure FIV/ICSI.
- 3) L'impact de l'élévation précoce de la progestérone plasmatique le jour du déclenchement de l'ovulation. Nous avons comparé le profil transcriptomique au cours de la transition des phases pré-réceptive et réceptive sécrétoire de l'endomètre chez les patientes ayant un taux normal *versus* élevé de progestérone. Dans un deuxième temps, nous avons appliqué notre test de la réceptivité endométriale afin d'analyser la réceptivité endométriale chez ces deux groupes de patientes.
- 4) L'impact des traitements hormonaux substitutifs (THS) sur la réceptivité endométriale. D'abord nous avons comparé par une approche transcriptomique, l'expression globale des gènes endométriaux chez des patientes receveuses de don d'ovocytes en cycle THS à celui de patientes en cycle naturel. Par la suite, nous avons exploré le statut de la réceptivité endométriale par le biais de notre test de la réceptivité endométriale.

Chapitre 1 Introduction bibliographique

1. L'endomètre

À partir de la puberté jusqu'à la ménopause, l'utérus de la femme subit des modifications mensuelles cycliques dans le but de se préparer à une grossesse : le cycle menstruel. L'utérus est un organe creux formé de deux sections anatomiques, le corps (cavité utérine) et le col (canal endocervical). La paroi du corps utérin est formée par le périmétrium, le myomètre et l'endomètre. Le périmétrium est une tunique séreuse externe. Le myomètre est le muscle interne de la paroi utérine, composé de muscles lisses et de tissu conjonctif. L'endomètre est la muqueuse qui tapisse l'intérieur de la cavité utérine qui subit de nombreuses modifications morphologiques et fonctionnelles cycliques (Noyes *et al.*, 1950). Ces modifications, contrôlées par des hormones sexuelles, préparent l'endomètre à soutenir l'implantation d'un embryon, la mise en place du placenta et le développement du fœtus.

1.1 Description morphologiques de l'endomètre

L'endomètre est composé de deux couches : la couche basale et la couche fonctionnelle. La couche basale (résiduelle) est adjacente au myomètre, elle est plus mince et subit peu de modifications au cours du cycle menstruel. Quant à la couche fonctionnelle, elle subit d'importants changements morphologiques mensuels et elle est éliminée à la fin de chaque cycle. La couche basale permet de régénérer l'endomètre fonctionnel au cycle suivant (Trévoux, 2009).

L'endomètre est un organe glandulaire constitué d'un épithélium cylindrique simple, appelé l'épithélium luminal, sa lame basale repose sur un épais stroma de tissu conjonctif présentant des invaginations formées par de nombreuses glandes tubuleuses simples, l'épithélium glandulaire (Trévoux, 2009). L'épithélium luminal, composé de cellules ciliées et sécrétrices, est polarisé, avec un pôle apical et basal. La lame basale sert d'attache et de soutien au tissu épithélial qui la recouvre, elle contient des protéines telles que le collagène, la laminine et des glycoprotéines. Le stroma de tissu conjonctif est formé de la matrice extracellulaire (MEC) et de cellules, comprenant principalement des cellules du système immunitaire: macrophages, leucocytes soit les lymphocytes naturelles tueuses utérines (uNK, uterin natural killer), lymphocytes T et un peu de lymphocytes B et grands lymphocytes granuleux, et finalement de cellules stromales de type fibroblaste (Glasser *et al.*, 2002). Les cellules stromales produisent les composants de la MEC. La proportion, les fonctions et la structure des différentes cellules endométriales varient au cours du cycle menstruel. Les interactions entre les cellules sont cruciales pour le remodelage de l'endomètre (Trévoux, 2009).

Des artères utérines vascularisent l'endomètre. Les artères droites sont courtes et irriguent la couche basale. Les artères spiralées atteignent la couche fonctionnelle, elles sont longues et sinueuses et entourent les glandes épithéliales. Les artères spiralées sont affectées par les modifications hormonales au cours du cycle menstruel (Trévoux, 2009).

1.2 Le cycle menstruel

Au cours de la vie fertile d'une femme, l'endomètre est modifié de façon cyclique passant par une phase de croissance (phase proliférative), de différenciation sécrétoire (phase sécrétoire) puis, en l'absence d'implantation, les menstruations (phase menstruelle), ensuite le cycle reprend avec une régénération de l'endomètre (Tortora et Derrickson, 2007). Ces modifications ont pour but de créer un environnement adapté à la nidation de l'embryon. Les changements cycliques de l'endomètre coïncident avec les changements cycliques ayant lieu dans les ovaires.

Le cycle menstruel est contrôlé par l'axe hypothalamo-hypophysaire ovarien. La sécrétion de façon pulsative de la gonadolibérine (GnRH) par l'hypothalamus contrôle la synthèse et la sécrétion par l'adénohypophyse de deux gonadotrophines : l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). Ces gonadotrophines hypophysaires agissent sur les ovaires et contrôlent la sécrétion d'hormones ovariennes : les œstrogènes (œstradiol, l'œstriol et œstrone) et la progestérone. Ces hormones dirigent les changements histologiques et biochimiques de l'endomètre. Les œstrogènes contrôlent la croissance et le remodelage des cellules endométriales, alors que la progestérone arrête la prolifération causée par l'œstrogène et entraîne plutôt une différenciation cellulaire. Les changements hormonaux au cours du cycle menstruel sont régulés par un mécanisme de rétrocontrôles positif et négatif (Messinis *et al.*, 2014). Les hormones ovariennes sont les médiateurs principaux de ces rétrocontrôles. De plus, les inhibines A et B participent au rétrocontrôle négatif de la FSH (Messinis *et al.*, 2014).

Par convention, le jour 1 du cycle menstruel est défini par le premier jour des menstruations. En moyenne, un cycle menstruel dure 28 jours, bien qu'il soit reconnu que la durée d'un cycle menstruel varie et n'est pas nécessairement constant d'un cycle à l'autre.

1.2.1 Phase menstruelle

La phase menstruelle représente les 3-4 premiers jours du cycle. Un nouveau cycle menstruel recommence avec la partie fonctionnelle de l'endomètre qui est éliminée par une nécrose ischémique, causant un saignement menstruel. L'élimination est causée par une chute des taux d'œstrogènes et de

progestérone. De plus, une vasoconstriction spastique des artères spiralées prive la couche fonctionnelle d'oxygène et gorge le stroma de sang causant le saignement menstruel. Les glandes endométriales arrêtent de sécréter. Le stroma et les glandes se dégradent, il y a apoptose cellulaire et desquamation du tissu. La section basale de l'endomètre, irriguée par les artères droites, reste intacte (Tortora et Derrickson, 2007).

1.2.2 Phase proliférative

Les jours 4 à 14 constituent la phase proliférative. Pendant cette phase, la muqueuse utérine croît. La prolifération des cellules épithéliales et stromales de l'endomètre est stimulée par l'œstradiol sécrété par les follicules ovariens en croissance. L'épithélium luminal et glandulaire se reconstruisent, les glandes deviennent rectilignes et étroites. Le stroma prolifère, s'épaissit et se vascularise. Une activité mitotique est détectée dans les cellules endométriales (Ferency *et al.*, 1979). L'endomètre croît de 0,5 mm à 3-4 mm d'épaisseur en moyenne (Glasser *et al.*, 2002). Cette phase se termine par une brusque décharge de LH qui cause la libération de l'ovocyte du follicule ovarien (Tortora et Derrickson, 2007).

1.2.3 Phase sécrétoire

La phase sécrétoire s'étend des jours 14 à 28 du cycle, elle est principalement sous l'influence de la progestérone, sécrétée par le corps jaune (*corpus luteum*), une glande endocrine résultant de la transformation du follicule ovarien rompu lors de l'ovulation. Les glandes endométriales deviennent tortueuses, se dilatent et s'élargissent. Elles développent leur activité sécrétoire et produisent une sécrétion épaisse, abondante et riche en glycogène et glycoprotéines, appelée mucus. C'est au courant de la phase mi-sécrétoire, aussi appelée phase réceptive, que l'embryon peut s'implanter dans la muqueuse utérine afin de continuer son développement. Durant cette phase, l'endomètre atteint en moyenne une épaisseur de 7 à 8 mm. Les artères et les vaisseaux sanguins parallèles aux glandes endométriales s'allongent et augmentent de diamètre, ils s'avancent vers les couches superficielles et deviennent fortement spiralées (Trévoux, 2009). S'il y a implantation embryonnaire, l'embryon produit du hCG (Hormone chorionique gonadotrope, analogue fonctionnel de la LH) qui permet de maintenir le corps jaune. L'hCG intervient au niveau de l'hypophyse et incite le corps jaune à continuer de sécréter la progestérone et les œstrogènes pour maintenir la muqueuse utérine et provoquer l'interruption des cycles menstruel et ovarien. En l'absence d'implantation, le corps jaune s'atrophie et la phase menstruelle débute (Tortora et Derrickson, 2007).

1.3 La fenêtre d'implantation

L'implantation est un évènement biologique complexe, lors duquel l'embryon se connecte physiquement et biologiquement à l'endomètre maternel afin de former un placenta qui sera l'interface entre le fœtus en croissance et la circulation sanguine maternelle. Le succès de l'implantation embryonnaire dépend de trois facteurs : un embryon de qualité doit être présent, l'endomètre doit être réceptif et une synchronisation ainsi qu'un dialogue entre ces deux entités doivent se produire.

Chez l'humain, le processus d'implantation est possible seulement pendant une courte période, nommée la fenêtre d'implantation (Psychoyos, 1986). Elle se situe 7 à 10 jours après la décharge de LH, durant la phase mi-sécrétoire et dure environ 48 heures (Wilcox *et al.*, 1999 ; Martín *et al.*, 2002). C'est seulement pendant cette période que l'embryon peut s'attacher et pénétrer l'endomètre. En dehors de la fenêtre d'implantation, l'endomètre est réfractaire à l'implantation embryonnaire. La fenêtre d'implantation dépend de l'expression de chimiokines, de facteurs de croissance, de métalloprotéinases (MMPs) et de molécules d'adhésion sécrétés par les cellules endométriales. La durée de la fenêtre d'implantation est une caractéristique d'espèce.

2. L'implantation

La venue d'une grossesse nécessite une succession d'étapes comprenant l'ovulation d'un ovocyte compétent, la production de spermatozoïdes matures, la fécondation de l'ovocyte par un spermatozoïde, le développement d'un embryon viable euploïde et l'implantation réussie de celui-ci au sein de l'endomètre réceptif.

2.1 Développement folliculaire et ovocytaire

Les ovaires ont une double fonction 1) le développement, maturation et ovulation des ovocytes et 2) la sécrétion des stéroïdes sexuels : la progestérone et les œstrogènes. La libération des stéroïdes sexuels permet de synchroniser les cycles menstruel et ovarien.

2.1.1 Follicule primordial

Les ovaires sont le site de l'ovogénèse (production d'ovules), un processus qui se déroule sur plusieurs années. La réserve ovocytaire se constitue pendant la vie embryonnaire, ainsi tous les ovocytes (ovules immatures) d'une femme sont déjà formés à sa naissance. Pendant le développement fœtal, les cellules germinales (ovogonies) se différencient en ovocytes primaires bloqués au stade méiotique de la prophase I (première division méiotique). Au 7^{ème} mois de grossesse, ces ovocytes sont entourés individuellement d'une couche uni-stratifiée de cellules épithéliales folliculaires aplaties. Ensemble,

l'ovocyte primaire et l'épithélium folliculaire, forment le follicule primordial. Les follicules primordiaux demeurent à ce stade en quiescence pendant des années (Tortora et Derrickson, 2007). L'épuisement de la réserve ovarienne débute dès la vie fœtale. À 20 semaines, le fœtus possède un nombre maximum de 6-7 millions d'ovocytes, ce nombre diminue pour atteindre 1-2 millions à la naissance, 300 000-500 000 à la puberté, 25 000 à 37 ans et 1 000 à 51 ans (Fleming *et al.*, 2015).

2.1.2 La folliculogénèse

La folliculogénèse débute pendant la vie fœtale par la mise en place des follicules primordiaux. De la naissance à la puberté, la folliculogénèse est bloquée. À la puberté, une cohorte de follicules primordiaux s'engage à chaque cycle menstruel dans la maturation folliculaire en passant des stades follicules primaires, secondaires (pré-antraux), antraux puis follicules pré-ovulatoires (de Graaf) (figure 1).

Cependant, un seul ou deux follicules primordiaux vont arriver au stade de follicules antraux, les autres mourants par atrophie. Le follicule primaire est composé d'un ovocyte primaire entouré d'une matrice glycoprotéique, la zone pellucide. Cette membrane est entourée d'une couche de cellules folliculeuses devenues cubiques. Le follicule se transforme en follicule pré-antral, composé de l'ovocyte primaire entouré maintenant de plusieurs couches folliculeuses formant la granulosa. Les cellules de la granulosa sont associées entre elles et avec l'ovocyte par des jonctions communicantes, permettant l'échange d'ions et de petites molécules. Par ailleurs, une couche de tissu conjonctif se condense autour du follicule pré-antral et se transforme en thèque interne. À ces stades, les follicules répondent peu à la stimulation des gonadotrophines. Lors de la maturation du follicule antral, une cavité (antrum) remplie de fluide folliculaire se forme à l'intérieur de la granulosa. De plus, l'ovocyte primaire est entouré de cellules de la granulosa différenciées, les cellules du cumulus. Le tissu entourant le follicule est différencié en une thèque interne contenant des cellules riches en lipides produisant des hormones et une thèque externe, vascularisée et fibreuse. Le follicule pré-ovulatoire possède une large cavité antrale entourée de la granulosa. L'ovocyte est encerclé d'une seule couche de cellules folliculeuses, appelée la corona radiata (Sadeu et Nogueira, 2011 ; Baerwald *et al.*, 2012).

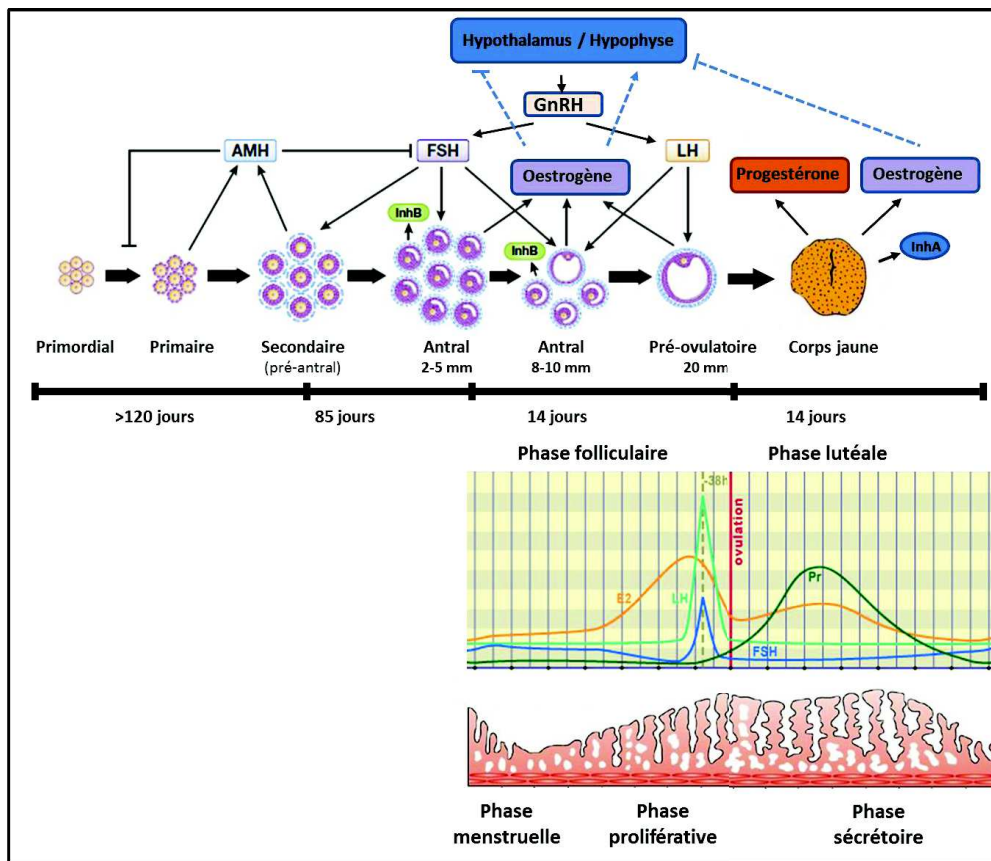


Figure 1 Folligulogénèse et enchaînement des rétroactions contrôlant la fonction ovarienne

Les follicules ovariens passent par les stades primordial, primaire, secondaire, antral, pré-ovulatoire et suite à l'ovulation le follicule se transforme en corps jaune. Le cycle ovarien se divise en phases folliculaire et lutéale. Le cycle utérin quant à lui, se divise en phases menstruelle, proliférative et sécrétoire. Au début du cycle, l'hypothalamus sécrète de façon pulsative de la GnRH. La sécrétion de la GnRH stimule la production par l'hypophyse de FSH et LH. La FSH stimule la croissance des follicules dans les ovaires. Les œstrogènes (E2) et l'inhibine B (InhB) sont sécrétés par les follicules ovariens en croissance (antral). Les taux d'œstrogènes modérés sécrétés par les follicules en croissance causent un rétrocontrôle négatif et inhibent la libération de GnRH, FSH et LH. Le follicule pré-ovulatoire sécrète des œstrogènes et lorsque les œstrogènes atteignent une valeur seuil, un rétrocontrôle positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire provoque une augmentation des sécrétions de FSH et surtout de LH. Le pic de LH provoque l'ovulation environ 38 heures plus tard. Le follicule rompu se transforme en corps jaune et sécrète de la progestérone (Pr), un peu d'œstrogènes et l'inhibine A (InhA). Ces hormones exercent un rétrocontrôle négatif et inhibent la libération de GnRH, FSH et LH. (Adaptée de Fleming *et al.*, 2015 et du site web embryology.ch)

2.2 Le cycle ovarien

Le cycle ovarien est divisé en deux phases distinctes : folliculaire et lutéale. Les changements cycliques ovariens coïncident avec les changements cycliques endométriaux, la synchronisation de ces deux cycles est rapportée par la figure 1.

2.2.1 Phase folliculaire

La phase folliculaire représente la phase de maturation finale des follicules, elle commence au début des menstruations jusqu'à l'ovulation, soit environ 14 jours. Cette phase est gonado-dépendante et l'œstradiol est l'hormone dirigeante. Cette phase comprend : le recrutement, la croissance, et la sélection du follicule dominant (Tortora et Derrickson, 2007).

Les cellules de la granulosa des follicules primaires, pré-antraux (secondaires) et des petits follicules antraux, sécrètent l'hormone anti-müllérienne (AMH). Lorsque la croissance folliculaire devient dépendant de la FSH, la sécrétion de l'AMH est arrêtée (Weenen *et al.*, 2004). L'AMH est impliquée dans la régulation du nombre de follicules primordiaux qui entament leur maturation, cette hormone empêche un épuisement précoce de la réserve ovarienne (La Marca *et al.*, 2009). En fin de phase lutéale, le corps jaune dégénère et diminue ses sécrétions de progestérone et d'œstrogènes, causant une augmentation de FSH (figure 1). Cette élévation transitoire de FSH au début du cycle folliculaire est appelée la fenêtre de recrutement. Une cohorte de follicules antraux est sélectionnée et entame le processus de maturation. La LH stimule les cellules de la thèque interne qui sécrètent des androgènes (androstènedione et testostérone). Alors que la FSH stimule la prolifération des cellules de la granulosa qui convertissent, par le biais de l'enzyme aromatasase, ces androgènes en œstrogènes (androstènedione en estrone et testostérone en œstradiol). De plus, l'inhibine B est produite par les cellules de la granulosa de la cohorte des petits follicules antraux en croissance (figure 1) (Messinis *et al.*, 2014). Les taux d'œstrogènes modérés, ainsi que les taux élevés d'inhibine B, causent un rétrocontrôle négatif et inhibent la libération des gonadotrophines (figure 1) (Messinis 2006 ; Tortora et Derrickson, 2007 ; Sadeu et Nogueira, 2011 ; Baerwald *et al.*, 2012).

Parmi la cohorte de follicules recrutés, un seul follicule dominant est sélectionné lors de la phase mi-folliculaire. Les autres follicules de la cohorte vont subir une atrophie, soit une dégénérescence par apoptose. Ce follicule dominant possède une sensibilité accrue à la FSH. À ce stade, les taux d'inhibine B diminuent, alors que ceux de l'inhibine A demeurent bas pendant toute la phase folliculaire (Groome *et al.*, 1996). Lorsque ce follicule atteint le stade pré-ovulatoire, il libère brusquement de fortes quantités

d'œstrogènes. Dès que les taux d'œstrogènes dépassent un certain seuil, un rétrocontrôle positif est provoqué sur la GnRH et sur la libération de FSH et de LH (figure 1). Ceci conduit à une décharge de LH très importante et, dans une moindre mesure, de FSH. Sous l'action de ce pic de LH, l'ovocyte primaire achève sa maturation. Il reprend la division méiotique et se bloque en métaphase II. Il y a maturation cytoplasmique et membranaire, synthèse de protéines, modification des organites ainsi que la dissociation des cellules du cumulus. L'ovocyte pré-ovulatoire est entouré de cellules du cumulus formant une masse compacte. Suite à la décharge de LH, un processus de mucification des cellules du cumulus s'enclenche. Il s'agit d'un changement morphologique et structurel, les cellules augmentent de volume et les espaces intercellulaires se remplissent de glycoprotéines, de protéoglycanes et d'acide hyaluronique, des composants majeurs de la MEC. Environ 24 à 38 heures après la brusque élévation des gonadotrophines, le follicule pré-ovulatoire se rompt. Lors de l'ovulation, l'ovocyte en métaphase II entouré de la corona radiata et des cellules du cumulus est expulsé dans la trompe utérine. Normalement, un seul follicule pré-ovulatoire par cycle est formé et libéré de l'ovaire. Ainsi, seule une minorité de follicules vont atteindre l'ovulation (<0.1%) (Tortora et Derrickson, 2007 ; Sadeu et Nogueira, 2011 ; Messinis *et al.*, 2014).

2.2.2 Phase lutéale

La phase lutéale débute après l'ovulation et se termine par la dégénérescence du corps jaune. Durant cette phase, les ovaires préparent l'implantation. La partie restante du follicule ovulé se transforme en corps jaune et devient une glande endocrine temporaire. L'antrum se résorbe, les cellules de la granulosa deviennent des cellules lutéiniques et les cellules thécales deviennent des cellules para-lutéiniques sous l'influence de LH. Le corps jaune sécrète la progestérone, un peu d'œstrogènes et l'inhibine A. Ces hormones provoquent un rétrocontrôle négatif sur la production des gonadotrophines; entre autres, les haut taux d'inhibine A provoquent une diminution de la sécrétion de FSH (figure 1) (Muttukrishna *et al.*, 2002). Une hausse des taux d'inhibine B est observé 48h après l'ovulation, ensuite les taux d'inhibine B restent bas en phase lutéale (Groome *et al.*, 1996). S'il n'y a pas de fécondation, les bas taux plasmatiques de FSH et LH, entraînent la dégénérescence du corps jaune. L'atrophie du corps jaune se traduit par une chute du taux de progestérone et les menstruations. De plus, une légère augmentation de FSH enclenche une nouvelle croissance des follicules ovariens. S'il y a implantation, l'hCG produit par l'embryon permet de maintenir le corps jaune qui sécrète, à son tour, la progestérone et les œstrogènes. A partir du 2^e ou 3^e mois de grossesse, le placenta prend en charge la sécrétion de ces hormones et le corps jaune dégénère (Tortora et Derrickson, 2007).

2.3 Développement embryonnaire précoce

La fécondation de l'ovule mature par un spermatozoïde mature, suite à la capacitation, a lieu dans la trompe utérine 12 à 24 heures après son expulsion de l'ovaire. La fusion de l'ovule et du spermatozoïde déclenche l'activation du zygote par l'induction de la fin de la méiose, suivie de la formation des pronuclei. Durant quelques jours, le développement de l'embryon est indépendant de la mère. Le zygote débute sa division cellulaire mitotique approximativement 24 heures après la fécondation. L'embryon continue à se diviser toutes les 10 heures environ, formant des blastomères dont la taille réduit au cours des divisions. Au 4^e jour, l'embryon se compacte et devient une morula, celle-ci est formée de 16 à 32 blastomères pluripotents. La morula est toujours renfermée dans la zone pellucide qui entourait l'ovocyte. Au 5^e ou 6^e jour suivant la fécondation, une cavité blastocœlique se creuse à l'intérieur de l'embryon. L'embryon rendu au stade blastocyste est formé de deux lignées cellulaires : la masse cellulaire interne (MCI) et le trophoctoderme. La MCI est une sphère de blastomères indifférenciés qui deviendront le fœtus. Le trophoctoderme est une couche cellulaire périphérique compactée formée d'une centaine de cellules qui deviendra le placenta. À ce stade du développement embryonnaire, la zone pellucide s'amincit. Un schéma du développement ovocytaire et embryonnaire jusqu'à l'implantation est présenté à la figure 2.

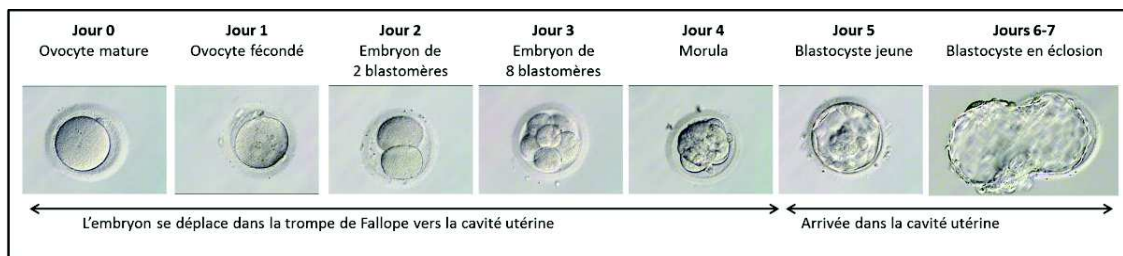


Figure 2 Développement embryonnaire précoce

L'ovule mature est fécondé par un spermatozoïde dans la trompe de Fallope. Le zygote passe ensuite par une série de clivages tout en se déplaçant vers l'utérus. Vers le 5^e jour, l'embryon atteint le stade de blastocyste. Ce dernier se libère de sa zone pellucide et peut initier son implantation dans l'endomètre.

Aucune activité transcritionnelle ne se produit initialement dans l'embryon. L'ARNm maternelle et les protéines synthétisées et accumulées par l'ovocyte, lors de ces phases immatures, régissent les premières divisions cellulaires de l'embryon (Dobson *et al.*, 2004). L'activation du génome varie entre les

espèces, elle se produit chez l'humain entre les stades de 4 à 8 cellules, soit 3 jours après la fécondation (Braude *et al.*, 1988). Les divisions subséquentes sont dirigées par le génome de l'embryon.

2.4 Préparation endométriale à l'implantation

À cette période, le rôle principal de l'endomètre est d'attirer le blastocyste et de préparer la matrice à son invasion. Tel que décrit précédemment, une séquence d'évènements a lieu dans l'endomètre pendant la période mi-sécrétoire, principalement contrôlée par la progestérone, des enzymes protéolytiques, des facteurs de croissance, des cytokines (médiateurs solubles) incluant les chimiokines (Huppertz *et al.*, 1998 ; Miller, 1998 ; Bischof et Campana, 2000 ; Seval *et al.*, 2004 ; Hannan et Salamonsen, 2008).

2.4.1 Modifications morphologiques de l'épithélium luminal

Lors de la phase sécrétoire des micro-protrusions cytoplasmiques transitoires se développent à la surface apicale de l'épithélium luminal endométrial : des pinopodes (Bentlin-Ley *et al.*, 2000). Chez l'humain, un pinopode mesure environ 6 µm et couvre entièrement la surface d'une cellule épithéliale (Nikas *et al.*, 1999). La présence et le développement des pinopodes est dépendant de la progestérone (Psychoyos 1973). Cependant, la fonction de ces structures dans le processus d'implantation n'est pas défini (Murphy *et al.*, 2000). Les pinopodes absorbent activement le liquide utérin, expriment des chimiokines et des molécules d'adhésion cellulaire qui pourraient attirer le blastocyste vers l'épithélium luminal et faciliter le processus d'adhésion (Bentin-Ley *et al.*, 1999). La durée rapportée de la présence des pinopodes lors de la phase sécrétoire varie entre 48 h et 7 jours selon les études (Nikas *et al.*, 1999 ; Quinn et Casper, 2008).

2.4.2 Décidualisation

En phase mi-sécrétoire, un changement morphologique et biochimique des cellules du stroma endométrial se produit: ce processus est appelé la décidualisation (King *et al.*, 1991 ; Gellersen *et al.*, 2007). La décidualisation est définie comme la différenciation des cellules du stroma endométrial en cellules déciduales. Les cellules stromales de type fibroblastique se transforment en cellules polygonales plus arrondies, d'une morphologie proche à celle des cellules épithéliales (Gellersen *et al.*, 2007) (figure 3).

Cette différenciation est initiée sous la dépendance de la progestérone sécrétée par le corps jaune. Ces cellules se remplissent de glycogène et expriment des marqueurs typiques de la décidualisation, tel que la prolactine, IGFBP-1 (insulin like growth factor binding protein-1) et la connexine 43 (Gellersen et

Brosens, 2003). Les cellules déciduâlisées ont des fonctions différentes des cellules non-déciduâlisées : elles sécrètent des facteurs de croissance, cytokines et protéases, des régulateurs importants de la réponse immunologique, de la vascularisation et de la régulation de l'implantation embryonnaire. La déciduâlisâtion est un processus progressif et les cellules à proximité des artères spiralées se différencient d'abord, suivies par les cellules des couches superficielles de l'endomètre. La déciduâlisâtion des cellules endométriales permet de créer une MEC riche en laminine, héparanes, protéoglycanes et collagène IV, indispensable au processus d'implantation (Giudice, 2003).

Le décidua est une matrice dense qui forme une barrière physique et régule ainsi l'invasion trophoblastique. Le décidua favorise l'attachement de l'embryon par le biais de sécrétion de cytokines locales et permet de résister aux agressions inflammatoires et oxydatives (Kliman, 2000). Chez l'humain, le processus de déciduâlisâtion est enclenché lors de chaque cycle menstruel indépendamment de la présence d'un embryon, alors que chez la souris, la déciduâlisâtion ne débute qu'après l'implantation (Saleh *et al.*, 2011 ; Gellersen *et al.*, 2007). La perturbation du processus de déciduâlisâtion des cellules endométriales est associée à des fausses couches à répétition (Salker *et al.*, 2010).

Il est possible de mimer la signalisation de la progestérone *in vitro*, donc d'induire la déciduâlisâtion, en ajoutant de l'AMPC dans le milieu de culture des cellules endométriales (figure 3) (Saleh *et al.*, 2011). L'AMPC est le second messenger de la signalisation induite par la progestérone et provoque l'expression de la prolactine (Brar *et al.*, 1997). Par contre, le mécanisme par lequel l'AMPC induit la déciduâlisâtion n'est pas complètement élucidé, mais l'activation de la protéine kinase A (PKA) est impliquée (Telgmann *et al.*, 1997).

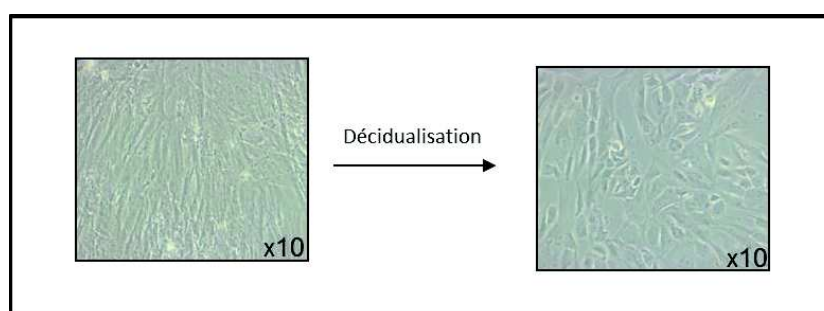


Figure 3 Déciduâlisâtion des cellules stromales endométriales

Changement morphologique des cellules stromales endométriales humaines cultivées *in vitro* au cours de la déciduâlisâtion, sous l'action de l'AMPC, le second messenger de la signalisation induite par la progestérone.

Cependant, il est important de souligner que le processus de décidualisation a été majoritairement étudié dans des modèles de culture *in vitro*, principalement avec les cellules endométriales stromales et ce, aussi bien à partir de culture primaire que de lignées (Blois *et al.*, 2011). Ce qui, en soit, ne semble pas surprenant puisque les cellules stromales représentent le type cellulaire le plus abondant du stroma utérin. Pourtant, rappelons que la décidualisation, par définition, représente la différenciation de cellules du stroma utérin en cellules déciduales. Les cellules stromales n'étant pas le seul type cellulaire du stroma, il apparaît donc surprenant de continuer à approfondir nos connaissances dans ce domaine sans prendre en compte les autres types cellulaires du stroma. Par conséquent, à ce jour, le comportement de cellules endométriales épithéliales, aussi bien glandulaires que luminales, face au processus de décidualisation a été plus que rarement étudié. Pourtant, il existe de plus en plus de preuves du rôle clé des cellules épithéliales utérines dans la régulation du processus de décidualisation des cellules stromales (Pawar *et al.*, 2015 ; Pawar *et al.*, 2013). L'approfondissement de nos connaissances au regard du processus de décidualisation dépendra donc de notre capacité à développer un modèle expérimental pertinent à la physiologie utérine permettant de prendre en compte les différents type cellulaires du stroma utérin ainsi que l'organisation tridimensionnelle de ce tissu.

2.4.3 Invasion des cellules immunitaires

Le deuxième élément crucial de la préparation de l'endomètre en phase mi-sécrétoire est l'afflux et la prolifération de cellules immunitaires dont les uNK (uterine natural killer) (King *et al.*, 1998). Le nombre de macrophages augmente légèrement en phase pré-menstruel et augmente significativement en phase mi-sécrétoire (King, 2000). Les cellules uNK (CD56⁺, CD16⁻) sont généralement localisées sous la couche de cellules épithéliales glandulaires, autour des artères spiralées (King *et al.*, 1998). Ces cellules uNK modulent la réponse immune, participent à la décidualisation, contrôlent la transformation vasculaire et éventuellement l'invasion embryonnaire (Chaouat *et al.*, 2007). Les uNK ont une faible toxicité spontanée et leur potentiel cytotoxique est modulable selon l'environnement cytokinique. De plus, ces cellules sont phénotypiquement différentes de la population circulante de cellules NK, elles n'ont pas les mêmes fonctions et expriment un répertoire différent de cytokines.

Les cellules uNK sécrètent des cytokines Th2 à l'origine de l'immunitrophisme. Les lymphocytes T auxiliaires (Th, helper) se divisent en 3 sous-populations selon leur profil de sécrétion de cytokines (Th0, Th1 et Th2) (Chapel *et al.*, 2004). Les lymphocytes T précurseurs se différencient en lymphocytes Th0, qui ensuite produisent les Th1 ou Th2 dépendamment des cytokines présentes dans l'environnement. En effet, l'interleukine (IL) 12 provoque le développement des Th1 alors que l'IL4, celui des Th2. Les Th1 et

Th2 s'inhibent réciproquement. La réponse Th1 qui active le recrutement des macrophages est régulée par des cytokines pro-inflammatoires, tel que l'IL1, IL2, IL6, IL12, IL15, IL18, IFN γ (interferon- γ), le facteur de nécrose tumorale (TNF α). La réponse anti-inflammatoire médiée par les lymphocytes Th2 implique les cytokines IL4, IL5, IL10, IL13 et le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), contrôlant ainsi la prolifération des lymphocytes B (Challis *et al.*, 2009). Ces cytokines participent à la décidualisation et sont un élément très important du contrôle de la réponse immunitaire. Le succès de l'implantation dépend de l'équilibre entre les cytokines Th1 et Th2. Une coordination de la réponse immunitaire et de la décidualisation est nécessaire afin d'aboutir à une implantation réussie. Par la suite, le nombre de cellules uNK diminue en phase menstruelle (Chapel *et al.*, 2004).

2.4.4 Mécanisme de remodelage et de dégradation de la MEC endométriale

Le remodelage tissulaire de l'endomètre ainsi que l'invasion du trophoblaste sont associés à la dégradation et au remodelage des composants de la MEC. La dégradation de la MEC est initiée par deux groupes de protéases, soit les métalloprotéinases matricielles (MMPs), particulièrement MMP-2 et MMP-9 et le plasminogène (Salamonsen, 1999 ; Seval *et al.*, 2004). Le plasmine et les MMPs catalysent l'hydrolyse des composants de la MEC, tel que le collagène, l'élastine, la laminine et la fibronectine (Knapinska et Fields, 2012). Le plasminogène est converti en plasmine active par l'interaction avec l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) ou l'activateur tissulaire du plasminogène urinokinase (uPA). Les activateurs du plasminogène sont exprimés dans l'endomètre pendant tout le cycle menstruel, avec une expression plus élevée en phase proliférative (Chen *et al.*, 1992). L'enzyme plasmine est responsable de la dégradation de la fibrine en produit de dégradation soluble (fibrinolyse). De plus, la plasmine est impliquée dans la prolifération des tissus, l'adhésion cellulaire et régule l'activation de facteurs de croissance incluant le facteur de croissance transformant (TGF- β), le facteur de croissance des fibroblastes-2 (FGF-2) et le facteur de croissance des hépatocytes (HGF), ainsi que des MMPs (Deryugina et Quigley, 2012). La plasmine peut dégrader directement ou indirectement, par l'activation de MMPs, tous les composants de la MEC. L'expression des MMPs est sous le contrôle de la progestérone. Les MMPs sont des enzymes sécrétées sous formes inactives et sont activées par la plasmine ou d'autres MMPs. Les MMPs sont inhibés par des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs). Les TIMPs sont produits par les cellules déciduales et les cellules du trophoctoderme embryonnaire (Salamonsen, 1999). La balance MMPs/TIMPs est cruciale lors de l'implantation, particulièrement au niveau de la régulation de l'invasion.

2.5 Implantation embryonnaire

2.5.1 Phases de l'implantation

Lors de son développement, l'embryon migre dans la trompe de Fallope vers l'utérus. L'embryon atteint la cavité utérine environ 4 jours après sa fécondation. Ensuite, le blastocyste se libère de sa zone pellucide par une suite de contractions et d'expansions. Le blastocyste libre dans la cavité utérine peut alors débuter son implantation. Il y a initiation d'un dialogue synchronisé entre le blastocyste et l'endomètre dirigé localement par des hormones et des facteurs de croissance (Tabibzadeh et Babaknia, 1995). L'implantation se déroule en trois phases successives : l'apposition, l'adhésion et l'invasion (figure 4).

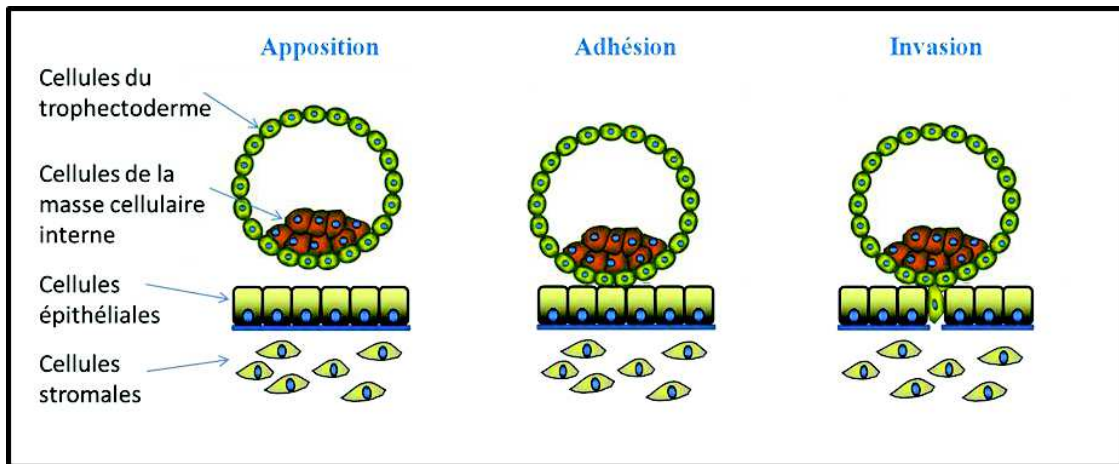


Figure 4 Phases de l'implantation embryonnaire humaine

Le processus d'implantation de l'embryon humain se divise en trois phases 1) l'apposition (présentation et orientation précise du blastocyste face au site d'implantation), 2) l'adhésion (mise en place des premiers contacts physiques entre l'endomètre et le blastocyste) et 3) l'invasion (pénétration du blastocyste dans l'endomètre).

2.5.1.1 L'apposition

Lors de l'apposition, le blastocyste oriente sa MCI face à l'endomètre et s'approche du tissu maternel (Bazer *et al.*, 2009). Les mécanismes qui régissent la phase d'apposition sont peu connus. Cependant, il est probable que des signaux paracrines entre le blastocyste et l'endomètre soient à l'origine de l'initiation d'un dialogue, permettant ainsi le bon positionnement de l'embryon. Dès l'apposition, les cellules embryonnaires débutent leur différenciation en deux feuillets distincts, le cytotrophoblaste et le syntiotrophoblaste.

2.5.1.2 L'adhésion

En préparation à l'adhésion, les jonctions d'ancrage et adhérentes des cellules épithéliales endométriales sont redistribuées d'une position sub-apicale vers la membrane plasmatique apico-latérale (Schumann *et al.*, 2015). Il y a, en effet, un remodelage et une perte partielle de la polarité des cellules épithéliales luminales (Bentin-Ley *et al.*, 2000) permettant ainsi la mise en place des premiers contacts entre l'embryon et l'endomètre.

Le premier contact se fait au niveau du pôle apico-latéral des cellules endométriales épithéliales (Bentin-Ley *et al.*, 2000) (figure 5). Des jonctions se forment entre les cellules épithéliales et le trophoctoderme par fusion de leurs desmosomes (Bentin-Ley *et al.*, 2000). Des signaux locaux paracrines sont produits entre l'embryon et l'épithélium. Il y a maintenant un attachement stable entre le blastocyste et l'épithélium luminal.

2.5.1.3 L'invasion

Ensuite, au cours de la phase d'invasion, les cellules du trophoctoderme déplacent les cellules épithéliales et traversent la lame basale pour atteindre les cellules stromales (figure 5). Le blastocyste s'enfouit dans la muqueuse épaisse et dégrade la MEC afin d'établir un contact vasculaire maternel. Les desmosomes fusionnés entre les cellules du trophoctoderme et les cellules épithéliales utérines migrent vers le pôle basal des cellules épithéliales permettant ainsi le passage de l'embryon à travers la barrière épithéliale luminale (Bentin-Ley *et al.*, 2000). Parallèlement, la lame basale se fragilise pour permettre l'envahissement du stroma par l'embryon.

Les mécanismes moléculaires qui régissent ces étapes d'apposition, d'adhésion et d'invasion ne sont à ce jour pas connus. Cependant, le remodelage des molécules d'adhésion, des sélectines, des galectines, des héparines sulfates, des protéoglycanes, ainsi que des facteurs de croissance liant les héparines, sont des éléments indispensables au processus d'implantation (Bazer *et al.*, 2009).

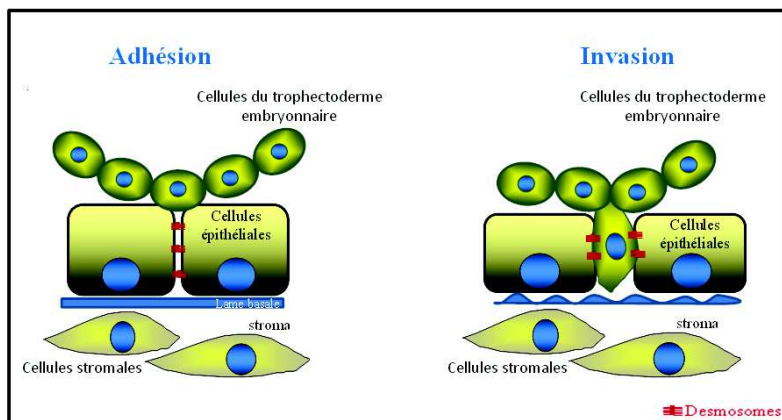


Figure 5 Phases d'adhésion et d'invasion du trophodermes embryonnaire

Lors de l'adhésion, l'attachement du blastocyste se fait au niveau des membranes apico-latérales des cellules épithéliales. Ensuite lors de l'invasion, les cellules épithéliales subissent une perte de leur polarité et les desmosomes entre les cellules du trophodermes et les cellules épithéliales fusionnent.

2.5.2 Signaux embryonnaires

Le blastocyste, libre dans la cavité utérine, envoie des signaux à l'épithélium utérin (et vice versa) afin de faciliter son implantation et initie ainsi un dialogue moléculaire. Des médiateurs solubles, tel que les cytokines (leukemia inhibitor factor (LIF) et l'interleukine 1 (IL1)), ainsi que des facteurs de croissance et leurs récepteurs, retrouvés dans l'endomètre et le blastocyste, jouent un rôle de reconnaissance mutuelle entre le blastocyste et l'endomètre et régulent les molécules d'adhésion (Simón *et al.*, 1998). Le dialogue précoce entre l'embryon et l'endomètre lors de l'implantation, a été très peu élucidé à ce jour, la majorité des informations découlent d'études chez l'animal ou de modèles *in vitro* humains. Toutefois, la comparaison des profils transcriptomiques des cellules du trophodermes embryonnaire à ceux des endomètres pendant la fenêtre d'implantation a permis d'identifier des couples récepteurs/ligands sur-exprimés dans l'un ou l'autre des compartiments, révélant ainsi des molécules potentiellement importantes dans ce dialogue précoce materno-fœtal (Haouzi *et al.*, 2011). Par exemple, le PGF (placental growth factor), de la famille pro-angiogénique des facteurs de croissance endothéliale vasculaire, ainsi que le facteur de croissance plaquette-dérivé (PDGFA), sont tous deux fortement exprimés dans les cellules du trophodermes alors que leurs récepteurs (KDR et PDGFRA) sont fortement exprimés dans les cellules endométriales (Haouzi *et al.*, 2011). Le PGF joue probablement un rôle au niveau de la régulation de l'angiogenèse et du remodelage des vaisseaux sanguins, étapes clés du processus de l'implantation (Haouzi *et al.*, 2011).

La famille des molécules d'adhérence cellulaire est composée de 4 membres : intégrines, sélectines, cadhérines et immunoglobulines. Ces ligands de surface, généralement des glycoprotéines, régulent l'adhésion intercellulaire et jouent un rôle d'importance dans le dialogue embryon-endomètre (Achache

et Revel, 2006 ; Margarit *et al.*, 2009). Dans l'endomètre réceptif, les transcrits de plusieurs membres de la famille des sélectines sont sur-exprimés (LGALS1, LGALS3, LGALS8 et LGALS3BP), alors que seule la sélectine COLEC12 est fortement exprimée dans les cellules du trophoctoderme. D'autre part, les molécules d'adhésion et les protéines de la MEC telles que la laminine (LAMA1) et la galectine-3 (GAL-3) sont fortement exprimées dans les cellules du trophoctoderme, alors qu'on retrouve une forte expression de GAL-3 dans l'endomètre réceptif (Haouzi *et al.*, 2011). Les galectines possèdent une spécificité de liaison pour les glycoprotéines de la membrane basale telles que la laminine et la fibronectine. Bien que l'implication des galectines endométriales dans les étapes du processus d'implantation n'ait pas encore été démontrée, la forte expression de la laminine (LAMA1) dans des cellules du trophoctoderme suggère une interaction possible avec les galectines de l'endomètre (Haouzi *et al.*, 2011).

Les intégrines, présentes aussi bien à la surface des cellules trophoctodermiques qu'endométriales, jouent un rôle clé dans la mise en place de l'adhésion stable entre les tissus fœtal et maternel. L'expression des sous-unités d'intégrines αV , $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ et $\beta 5$ a été rapportée dans le blastocyste humain (Campbell *et al.*, 1995), alors que seule l'intégrine αE (ITGAE) a été identifiée dans les cellules trophoctodermiques du blastocyste dans l'étude de Haouzi *et al.* (2011). Au niveau de l'endomètre réceptif, seules les intégrines ITGA9, ITGB1, ITGB8 and ITGAV sont fortement exprimées; ainsi que d'autres nombreux composants de la MEC comme la laminine alpha 2 (LAMA2), la fibronectine 1 (FN1), la fibrilline 1 (FBN1), des collagènes (COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3BP, COL4A5, COL5A1, COL5A2, COL6A1, COL6A2, COL6A3) et des TIMPs (TIMP2 et TIMP3), qui contrôlent l'adhésion intercellulaire et l'adhésion à la MEC (Haouzi *et al.*, 2011). La molécule d'adhésion MCAM, est aussi fortement exprimée dans les cellules du trophoctoderme, son rôle dans l'invasion du blastocyste a été rapporté par d'autres études (Haouzi *et al.*, 2011 ; Shih *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 2004). Un résumé de ces signaux est présenté à la figure 6. Ces données devraient permettre, dans un premier temps, d'identifier les acteurs moléculaires clés du processus d'implantation chez l'humain.

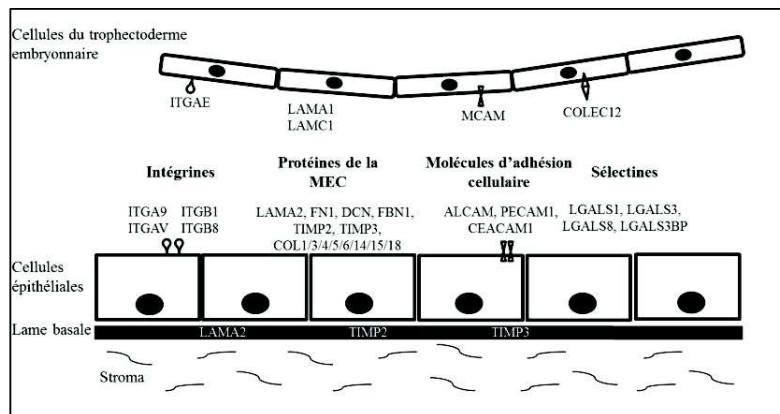


Figure 6 Dialogue précoce entre les cellules du trophoctoderme embryonnaire et l'endomètre, lors de l'implantation

Schéma de la distribution des molécules d'adhésions et des composants de la MEC à l'interface endomètre/blastocyste (Adapté de Haouzi *et al.*, 2011).

2.5.3 Réponse immunitaire à l'implantation

L'implantation embryonnaire est contrôlée par une réponse immunologique. Une réaction inflammatoire aigue caractérise la première phase de l'implantation embryonnaire, un dialogue immunotrophique se produit. Le recrutement des cellules immunes installe un environnement de tolérance immunitaire local et programmé qui permet à l'embryon de ne pas être rejeté par le tissu maternel (Lédée *et al.*, 2011). Lors de l'implantation de l'embryon, un affût de cellules uNK et de macrophages se produit, ces cellules attirent et favorisent l'invasion du blastocyste (Hanna *et al.*, 2006). Les uNK produisent des cytokines telles que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le facteur de croissance placentaire (PLGF) et l'angiopoïétine-2 (ANG-2) (Li *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2011 ; Hanna *et al.*, 2006). VEGF et PLGF sont des glycoprotéines membres de la famille de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire jouant un rôle crucial dans l'angiogenèse, processus indispensable à l'acquisition du phénotype de la réceptivité endométriale et donc, à l'implantation (Hanna *et al.*, 2006). D'ailleurs, des taux inférieurs de PLGF ont été mesurés chez des patientes en échecs d'implantation (Santi *et al.*, 2011). ANG-2 est une angiopoïétine qui inhibe l'effet de l'angiopoïétine-1 (ANG-1) qui, avec VEGF, régulent l'intégrité et la croissance vasculaire (Maisonpierre *et al.*, 1997). Ainsi le processus d'implantation débute par une déstabilisation inflammatoire transitoire suivie par l'établissement d'un environnement cytokinique tolérogène (Lédée *et al.*, 2011).

3. Assistance médicale à la procréation

Aujourd'hui, environ 15% des couples font face à des problèmes d'infertilité (ESHRE, 2011). Ces couples sont dirigés vers des centres d'AMP. Au sein de ces cliniques spécialisées, divers traitements sont offerts dont la FIV. Dans le cadre d'un traitement par FIV, la patiente va subir une stimulation ovarienne.

3.1 Stimulation ovarienne

La stimulation ovarienne consiste à provoquer le développement de plusieurs follicules antraux simultanément tout en évitant une ovulation spontanée. Ce traitement hormonal se déroule en 3 étapes : 1) la suspension de la fonction ovarienne afin de bloquer la production par l'hypophyse des gonadotrophines, 2) la stimulation du développement folliculaire par des gonadotrophines exogènes et, 3) l'induction de l'ovulation. Pour induire la phase de suspension, deux classes de médicaments sont essentiellement utilisées : les agonistes et les antagonistes à la GnRH. Ils agissent tous deux au niveau des récepteurs hypophysaires à la GnRH. Les agonistes miment l'effet de la GnRH et provoquent une phase de désensibilisation qui permet une mise au repos hypophysaire par une boucle de rétrocontrôle négatif. Les antagonistes inhibent de façon concurrentielle les récepteurs hypophysaires et bloquent ainsi les sécrétions des gonadotrophines. Ensuite des injections de FSH et/ou LH ou de gonadotrophine post-ménopausique humaine (hMG, human menopausal gonadotrophins) permettent de stimuler la croissance des follicules ovariens et de transformer un maximum de follicules antraux en follicules matures. La réponse ovarienne à la stimulation est estimée selon le compte de follicules antraux, les taux d'AMH et de FSH de la patiente. Au cours de la stimulation ovarienne, des contrôles échographiques et des dosages hormonaux permettent de suivre l'évolution des follicules (nombre et taille) et la réponse à la stimulation ovarienne, respectivement. Ceci permet de suivre la réponse de la patiente à la stimulation ovarienne afin d'obtenir une stimulation optimale tout en limitant les risques d'hyperstimulation. De plus, l'épaisseur et la qualité de l'endomètre sont vérifiées. Lorsque le nombre de follicules de plus de 14 mm est jugé optimal par le clinicien, l'ovulation est déclenchée artificiellement par l'injection d'hCG, synthétique ou urinaire, qui mime l'action de la décharge de LH. La ponction ovocytaire est planifiée 36 heures après la prise de ce médicament.

3.2 Développement embryonnaire *in vitro*

Une fois les complexes ovocyte-cumulus récupérés, les ovocytes matures sont fécondés soit par une injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI) ou une FIV. Le choix de la technique d'insémination dépend de la concentration et la mobilité des spermatozoïdes ainsi que l'historique médical des patients. Ensuite, les ovocytes fécondés normalement sont gardés en culture dans le

laboratoire d'AMP et leur développement est évalué quotidiennement selon des critères morphologiques. Les embryons sont généralement évalués au 2^e jour de développement (J2), 3^e (J3) et 5 et 6^e jours lors qu'ils ont atteint le stade blastocyste (J5 ou J6). Le nombre de cellules, leur taille, leur symétrie, le taux de fragmentation ainsi que le nombre de noyaux visibles par cellules, sont évalués (Nasiri et Eftekhari-Yazdi, 2015). Au stade de blastocyste, l'évaluation est complétée selon une classification différente qui inclue le nombre et le degré de compaction des cellules du trophoctoderme et de la MCI, l'expansion du blastocyste et l'éclosion de la zone pellucide (Gardner et Schoolcraft, 1999). Ces évaluations permettent d'établir un score afin de sélectionner le(s) embryon(s) avec le meilleur potentiel d'implantation. Les embryons jugés 'de qualité' seront transférés chez la patiente ou vitrifiés, pour une utilisation ultérieure.

3.3 Transfert embryonnaire

Suite à la culture des embryons sur 3, 5 ou 6 jours, un ou plusieurs embryons sont transférés dans l'utérus de la patiente. Plus de 80% des patientes traitées en AMP auront un transfert d'au moins un embryon. Le transfert d'embryon doit être synchronisé avec le moment où l'endomètre est au maximum de sa réceptivité. En 2011, en Europe, les taux de grossesse moyens par transfert embryonnaire frais étaient de 32.4% : 31.6% pour les cas d'ICSI et 33.2% suite à une FIV (ESHRE, 2011). Ainsi, malgré le transfert d'embryon(s) dits compétent(s), l'implantation fait souvent défaut. D'ailleurs, après trois transferts d'un ou plusieurs embryon(s) de bonne qualité sans l'obtention d'une grossesse, les patientes sont considérées ayant un problème de multiples échecs d'implantation. Ce défaut d'implantation peut être le reflet d'un problème de développement ou d'anomalie embryonnaire (ex : anomalie chromosomique), ou d'un problème de l'endomètre qui peut avoir plusieurs origines. En effet, un défaut de la réceptivité endométriale, une réponse immunitaire inadaptée tel qu'un recrutement insuffisant/excessif des cellules uNK, ou encore un remodelage vasculaire endothélial inadéquat peuvent être à l'origine d'échecs d'implantation (Lédée *et al.*, 2008 ; Voullaire *et al.*, 2002 ; Levi Setti *et al.*, 2004). Bien que les facteurs tels que l'âge de la patiente, la qualité ovocytaire, le contrôle de qualité du laboratoire d'AMP et les milieux de culture utilisés, ont une influence sur les taux d'implantation, il est estimé que les deux-tiers des échecs d'implantation sont amputables à des défauts de la réceptivité endométriale, alors que l'embryon lui-même serait responsable d'un tiers seulement de ces échecs (Simón *et al.*, 1998). L'aneuploidie embryonnaire accroît drastiquement avec l'âge maternel, bien qu'il s'agisse d'une problématique rencontrée à tout âge maternel (Franasiak *et al.*, 2014a). D'ailleurs, une proportion plus élevée d'anomalies chromosomiques (translocation, mosaïque, inversion, délétion) a

été observé chez une population de femmes ayant subi de multiples échecs d'implantation (Raziel *et al.*, 2002 ; Tarlatzis *et al.*, 2000). En effet, les embryons aneuploïdes ne s'implantent généralement pas, aboutissent à une fausse couche ou au développement d'un fœtus génétiquement anormal. Le diagnostic pré-implantatoire (DPI) permet d'évaluer la composition génétique des embryons et de sélectionner un embryon génétiquement normal pour le transfert. Brièvement, suite au prélèvement d'un blastomère à J3 ou de quelques cellules du trophoctoderme à J5-6, ces cellules embryonnaires sont analysées par génétique moléculaire afin de dépister les aneuploïdies. Les chromosomes 13, 14, 15, 16, 21, 22, X et Y sont généralement examinés (Franasiak *et al.*, 2014b). Cependant, plusieurs études ont montrées un effet délétère du DPI sur les taux de grossesses (Jasen *et al.*, 2008 ; Mastenbroek *et al.*, 2011).

Afin de diminuer la proportion de grossesses gémellaires à la suite de transfert de plusieurs embryons, à risque pour les patientes, les cliniques d'AMP tendent vers un transfert d'embryon unique. L'accroissement du nombre de transfert embryonnaire au stade de blastocyste, rendu possible grâce au développement de milieux de culture plus performants et la vitrification, a permis d'augmenter les taux d'implantation (Papanikolaou *et al.*, 2006). En effet, les transferts au stade blastocyste permettent 1) une sélection plus poussée de l'embryon en s'affranchissant des arrêts de développement embryonnaire observés lors de l'activation du génome embryonnaire au J3, 2) de diminuer les proportions de transfert d'embryon haploïde (Sandalinas *et al.*, 2001) et 3) de potentiellement synchroniser le développement embryonnaire à celui de l'endomètre.

3.4 Cryo-préservation et traitement hormonal substitutif

Suite au transfert d'embryon(s) ou à cause d'indications médicales obligeant à reporter le transfert d'embryon(s) frais au cours d'une tentative de FIV/ICSI, les embryons ou blastocystes surnuméraires de qualité sont vitrifiés. Les raisons médicales principales d'annulation du transfert frais sont le syndrome d'hyper-stimulation ovarienne caractérisé par une montée prématurée du taux plasmatique de la progestérone, une épaisseur endométriale insuffisante ou la présence de polypes. La technique de vitrification, a remplacé les techniques conventionnelles de congélation lente et est maintenant une procédure de routine dans la majorité des laboratoires d'AMP (AbdelHafez *et al.*, 2010). L'utilisation de fortes concentrations d'agents cryo-protecteurs permet de diminuer la température des embryons rapidement et cela, tout en évitant le passage par une phase cristalline (Sifer, 2014). Ainsi, lorsque la patiente est programmée pour un transfert d'embryons cryo-préserverés, elle subira un traitement hormonal substitutif (THS) dans l'objectif de rendre son endomètre mature. Les patientes ayant recours

à un don d'ovocytes subissent ce même type de traitement. Ce dernier est composé d'œstrogènes et de progestérone afin de mimer la régulation physiologique des hormones ovariennes. Bien qu'il existe de nombreux THS différents, d'une façon générale, l'œstrogène et la progestérone sont introduits en début et milieu de cycle respectivement.

Les embryons, à tous stades de développement embryonnaire, peuvent être préservés avec de bons taux de survie après décongélation et d'implantation suite au transfert. La vitrification permet d'éviter les effets délétères possibles de la stimulation ovarienne sur l'endomètre (Haouzi *et al.*, 2009a ; Haouzi *et al.*, 2009b ; Haouzi *et al.*, 2010), de préparer celui-ci de façon adéquate et ainsi, de mieux synchroniser la maturation embryonnaire et le développement endométrial. Selon l'ESHRE, les taux de grossesse en THS sont sensiblement diminués comparativement au transfert frais (23% *versus* 32%) (ESHRE, 2011). Cependant, une récente étude brésilienne, rapporte des taux de grossesse de 35.9% en transfert frais et 46.4% en THS sur l'analyse de 530 transferts (Roque *et al.*, 2015).

4. Réceptivité endométriale

4.1 Approches conventionnelles d'appréciation de la réceptivité endométriale

Les critères histologiques de datation de l'endomètre tout au long du cycle menstruel, mis en place dans les années 1950 par Noyes, ont été profusément utilisés (Noyes *et al.*, 1950). Cependant, ces critères ne sont pas assez précis pour apprécier la réceptivité endométriale. En effet, l'interprétation des résultats sont observateurs dépendants et des variations importantes, d'une part d'un cycle à l'autre, d'autre part, d'une femme à l'autre, ont été observées (Murray *et al.*, 2004). De plus, une étude multicentrique prospective a permis de démontrer que l'évaluation histologique en phase mi-sécrétoire ou post-sécrétoire ne permet pas de discriminer les patientes infertiles de celles fertiles (Coutifaris *et al.*, 2004).

Il a été suggéré que l'apparition de pinopodes pourrait être un indicateur de la réceptivité endométriale (Nardo *et al.*, 2002 ; Murphy, 2000 ; Nikas, 1999). Cependant, la présence de ces structures ne peut être un marqueur de réceptivité endométriale car ceux-ci sont retrouvés même en dehors de la fenêtre théorique d'implantation (Murphy, 2000 ; Quinn et Casper, 2008).

D'autre part, l'accessibilité de l'endomètre par l'échographie transvaginale a amené les cliniciens à se demander si le pronostic d'un cycle de FIV peut être corrélé à l'aspect ou à l'épaisseur de l'endomètre. Ainsi, des études ont évalué qu'un trouble de la prolifération endométriale (épaisseur < 6-8 mm ou > 15mm) est associé à une réduction significative des taux d'implantation et de grossesse (Reuter *et al.*,

1996). D'autre part, l'analyse de l'aspect de l'endomètre relayé par la combinaison de plusieurs paramètres (volume endométrial, aspect de l'endomètre, index de pulsatilité du flux utérin, index de résistance des artères utérines, index de vascularisation endométriale *etc.*) est certes indispensable à l'identification de patientes avec un très mauvais pronostic implantatoire, mais reste d'une très faible valeur pronostique dans l'appréciation même de la réceptivité endométriale (Alcázar, 2006).

Ainsi, à ce jour, les approches conventionnelles mises à la disposition du clinicien ne permettent pas d'évaluer de façon précise et systématique la réceptivité endométriale. Il apparaît donc primordial de développer des outils fiables d'appréciation de la réceptivité de l'endomètre.

4.2 Bio-marqueurs de la réceptivité endométriale

4.2.1 Bio-marqueurs uniques

Pendant de nombreuses années, la communauté scientifique a tenté de sélectionner un bio-marqueur unique permettant de déterminer la réceptivité endométriale. Les principaux marqueurs moléculaires proposés étant : l'intégrine $\beta 3$ (Lessey *et al.*, 1992), IL1 (Simón *et al.*, 1997) la calcitonine (Kumar *et al.*, 1998), l'amphiréguline (Das *et al.*, 1995), le facteur de croissance HB-EGF (Heparin binding) (Birdsall *et al.*, 1996), le colony stimulating factor-1 (CSF-1) (Klentzeris, 1997), le LIF (Stewart *et al.*, 1992), des mucines (Meseguer *et al.*, 1998, Horne *et al.*, 2005), des leptines (González *et al.*, 2000), le ligand à la sélectine-L (Genbacev *et al.*, 2003) ainsi que les gènes HOXA et COX (cyclooxygénase) (Davis *et al.*, 1999). Cependant, aucun de ces marqueurs ne s'est avéré utile dans le cadre de la pratique clinique (Aghajanova *et al.*, 2008).

4.2.2 Technologies Omics

Les technologies Omics, ont apporté de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes de régulation de la réceptivité endométriale. Ces technologies permettent de mesurer simultanément l'expression de milliers de gènes et de protéines, par exemple, et ainsi de générer des quantités importantes de données à des niveaux biologiques multiples. Ces technologies permettent de comparer deux groupes biologiques et d'identifier le profil d'expression différentiel entre eux. Dans le domaine, la majorité des études Omics, ont ciblé le transcriptome, qui mesure l'ensemble des ARNm, et le protéome qui mesure les protéines. Une revue des données Omics sur l'endomètre humain rapporte 269 publications pertinentes sur l'endomètre humain, dont 61% (164) d'études transcriptomiques (Altmäe *et al.*, 2014). Cependant, ces études incluent des endomètres normaux et pathologiques (endométriose, pré-éclampsie, cancer *etc.*) à diverses phases du cycle menstruel.

4.2.2.1 Transcriptome

Le transcriptome rapporte les gènes qui sont sur- ou sous-exprimés à un moment précis dans un tissu spécifique, en examinant le niveau d'expression des ARN messagers (ARNm) entre deux groupes biologiques. C'est une technologie de choix pour permettre, d'une part, l'identification de biomarqueurs, d'autre part, l'identification des sentiers signalétiques et mécanismes moléculaires pertinents de par la genèse de nombreuses données.

Les techniques de puces à ADN sur des prélèvements de l'endomètre ont montré la présence de profils d'expression différents à chacune des phases du cycle menstruel. Ainsi un profil moléculaire (signature moléculaire) permet de distinguer les phases menstruelles les unes des autres, et cela indépendamment des observations histologiques (Talbi *et al.*, 2006 ; Ponnampalam *et al.*, 2004 ; Kao *et al.*, 2002 ; Borthwick *et al.*, 2003 ; Punyadeera *et al.*, 2005).

Des modifications du profil d'expression des gènes de l'endomètre lors de la transition des phases pré-réceptives (LH+1/5) vers le stade réceptif (LH+7/9) ont été rapportées (Carson *et al.*, 2002 ; Díaz-Gimeno *et al.*, 2011 ; Haouzi *et al.*, 2009b ; Mirkin *et al.*, 2005 ; Riesewijk *et al.*, 2003 ; Talbi *et al.*, 2006). Les données transcriptomiques ont permis d'identifier des processus biologiques, des fonctions moléculaires et cellulaires participant à l'acquisition du phénotype de la réceptivité endométriale (Talbi *et al.*, 2006). Le nombre de gènes différentiellement exprimés dans l'endomètre pré-réceptif *versus* réceptif est très divergent entre ces études, variant de 107 à 2 878 (Haouzi *et al.*, 2012).

Seules deux études ont analysé des biopsies prélevées lors des phases pré-réceptive et réceptive au sein du même cycle des patientes, permettant ainsi de minimiser la variabilité inter-patiente (Haouzi *et al.*, 2009b ; Riesewijk *et al.*, 2003). Ces études ont montré que l'endomètre réceptif est caractérisé majoritairement par une activation transcriptionnelle drastique pendant la fenêtre d'implantation. Haouzi *et al.* (2009b) ont trouvé 1012 gènes différentiellement exprimés, dont 94% de gènes sur-exprimés et 6% sous-exprimés. Riesewijk *et al.* (2003) ont rapporté 211 gènes différentiellement exprimés, dont 73% de gènes sur-exprimés et 27% sous-exprimés.

Parmi les autres études transcriptomiques, l'étude de Díaz-Gimeno *et al.* (2011), a aussi retrouvé cette activation transcriptionnelle (60% gènes sur-exprimés et 40% sous-exprimés) alors que les 3 autres études ont plutôt trouvé des proportions similaires des gènes sur- et sous-exprimés pendant la fenêtre d'implantation (Carson *et al.*, 2002 ; Mirkin *et al.*, 2005 ; Talbi *et al.*, 2006).

Parmi ces études comparant les mêmes phases du cycle menstruel, seuls 2 gènes sont en commun à toutes ces études (Haouzi *et al.*, 2012). Ces deux candidats, sur-exprimés dans l'endomètre réceptif, sont SPP1 et IL15. SPP1 (secreted phosphoprotein 1), encore appelée ostéopontine, est une glycoprotéine structurelle sécrétée par la MEC. En se liant à une variété d'intégrines, elle stimule l'adhésion, la communication intercellulaire et la communication entre les cellules et la MEC. Cette protéine est donc impliquée dans l'adhésion cellulaire et joue un rôle clé dans l'implantation embryonnaire (Johnson *et al.*, 2014). IL15 est exprimée dans les cellules stromales et épithéliales de l'endomètre ainsi que dans le placenta. Elle est contrôlée par la progestérone et régule la prolifération des cellules uNK et d'autres composants du système immunitaire (Kitaya *et al.*, 2005).

Les disparités des résultats rapportés par ces études sont attribuées aux différences des méthodologies, tel que le moment du prélèvement endométrial (variant de LH +1 à LH+5 en phase pré-réceptive et de LH +7 à LH+9 en phase réceptive), l'âge des patientes (22-39 ans), le nombre limité d'échantillons de certaines études, le type de puce à ADN utilisé (Hu95A, Hu95A-E ou Hu133P) ainsi que les analyses bio-informatiques et statistiques (analyses par échantillons appariés) appliquées sur les données transcriptomiques (Riesewijk *et al.*, 2003 ; Díaz-Gimeno *et al.*, 2014 ; Haouzi *et al.*, 2009a ; Haouzi *et al.*, 2009b ; Haouzi *et al.*, 2012). De plus, les différences entre les populations étudiées, soit des patientes fertiles volontaires donneuses d'ovocytes (Carson *et al.*, 2002 ; Díaz-Gimeno *et al.*, 2011 ; Mirkin *et al.*, 2005 ; Riesewijk *et al.*, 2003), des patientes prises en charge pour une ICSI pour des raisons d'infertilité masculine (Haouzi *et al.*, 2009a), ou encore des patientes avec des pathologies endométriales bénignes (Talbi *et al.*, 2006), jouent probablement un rôle dans la disparité des résultats. Tous ces facteurs contribuent à la grande complexité d'effectuer une méta-analyse des données transcriptomiques endométriales (Ulbrich *et al.*, 2013).

Néanmoins, la transformation d'un endomètre non-réceptif au cours de la phase sécrétoire précoce en endomètre réceptif au cours de la phase mi-sécrétoire implique d'importantes modifications d'expression des ARNm. Les annotations fonctionnelles des gènes différentiellement exprimés dans l'endomètre réceptif de ces études rapportent d'importantes modifications des systèmes d'adhésion cellulaire et du remodelage de la MEC, facilitant probablement l'apposition, l'adhésion puis l'invasion trophoblastique, étapes primordiales de l'implantation. D'autre part, des voies de signalisation associées au phénotype d'acquisition de la réceptivité endométriale ont été identifiées : en particulier la signalisation du TGF- β , la cascade du complément et de la coagulation et la migration transendothéliale

leucocytaire, facilitant probablement l'implantation (Haouzi *et al.*, 2009b). De plus, une cartographie des facteurs de croissance, des cytokines dont les chimiokines, sur-exprimés pendant la fenêtre d'implantation a ainsi pu être établie.

L'identification d'une signature transcriptomique spécifique de la réceptivité endométriale a ouvert de nouvelles perspectives dans l'identification de bio-marqueurs de la réceptivité endométriale. Notre équipe, ainsi qu'une seconde, ont mis en place des tests d'appréciation de la réceptivité endométriale, décrits dans une prochaine section de ce manuscrit.

La majorité des études a analysé le tissu endométrial entier sans trier les différents types cellulaires. Quelques études ont isolé les cellules stromales et épithéliales par microdissection au laser ou par tri cellulaire par fluorescence (FACS) afin de vérifier les profils d'expression individuels des types cellulaires (Yanaihara *et al.*, 2005 ; Evans *et al.*, 2012 ; Spitzer *et al.*, 2012). Ces analyses ont démontré que les glandes et les cellules du stroma ont une signature transcriptomique distincte qui est modifiée au cours du cycle endométrial.

4.2.2.2 Protéome

À ce jour, la littérature dans ce domaine reste peu abondante. Cinq études ont comparé les profils protéomiques endométriaux au cours de la transition des phases prolifératives versus mi-sécrétoires en cycle naturel (Chen *et al.*, 2009 ; Parmar *et al.*, 2009 ; DeSouza *et al.*, 2005 ; Rai *et al.*, 2010 ; Chen *et al.*, 2015). Cependant, le croisement des données protéomiques de ces études démontre qu'il n'y a aucun candidat en commun à toutes ces études. Cette disparité de résultats est probablement en partie inhérente à la grande variabilité du moment de prélèvement de la biopsie (ex: phase sécrétoire dans l'étude de DeSouza *et al.* (2005) sans indication précise du jour de prélèvement *versus* milieu de la phase sécrétoire). D'autre part, seuls trois études, dont deux issues d'une même équipe, ont utilisé une approche protéomique globale (gel d'électrophorèse 2D et spectrométrie de masse) pour analyser le changement du profil d'expression protéique entre des échantillons d'endomètres sécrétoires pré-réceptifs et réceptifs (Domínguez *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2011). Li *et al.* (2006) ont identifié une seule protéine significativement modulée entre ces deux phases contre 31 dans leur étude de 2011 et 32 dans l'étude de Domínguez *et al.* (2009). L'annexine A4, qui est la protéine en commun à ces études, est augmentée d'un facteur 2.1 et 1.9 dans, respectivement, l'étude de Li *et al.* (2006, 2011) et Domínguez *et al.* (2009). Ce résultat est en accord avec une étude précédente montrant, par immunohistochimie et western blot, que cette protéine était fortement exprimée tout au long du cycle

menstruel, excepté pendant la phase précoce lutéale (Ponnampalam et Rogers, 2006). Cette même équipe a aussi démontré, sur des cultures d'explants d'endomètres prolifératifs, que la transcription et la traduction de cette protéine, annexine A4, était régulée par la progestérone. Bien que plusieurs protéines aient été identifiées comme différentiellement exprimées dans l'étude de Domínguez *et al.* (2009), les auteurs soulignent que seules deux protéines associées au cytosquelette, l'annexine A2 (ANX2) et la stathmine 1 (STMN1), étaient successivement régulées dans leurs deux expériences réalisées et validées par western blot et immunohistochimie. Ces résultats sont en accord avec un phénotype réceptif d'un endomètre, lequel est associé à un remodelage de l'organisation épithéliale (Aplin, 2007).

4.2.2.3 Comparaison des données transcriptomiques et protéomiques

La comparaison des données transcriptomiques et protéomiques, comparant le profil d'expression endométrial pendant la transition des stades pré-réceptifs *versus* réceptifs (Carson *et al.*, 2002 ; Díaz-Gimeno *et al.*, 2011 ; Domínguez *et al.*, 2009 ; Haouzi *et al.*, 2009a ; Li *et al.*, 2006 ; Mirkin *et al.*, 2005 ; Riesewijk *et al.*, 2003 ; Talbi *et al.*, 2006), montre que seul un gène, l'annexine A4, est identifié dans la majorité des études transcriptomiques (dans 5 études parmi les 6) et pour laquelle on retrouve une corrélation entre les taux d'ARNm et de protéines. Ces résultats ne sont, cependant, pas surprenant puisque la majorité des protéines sont régulées par des modifications post-traductionnelles (Singh et Nagaraj, 2006). D'autres gènes tels que l'annexine A2 (ANX2), l'oxydase monoamine A (MOA), TAGLN (transgelin 2), LCP1 (L-plastin), PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1), STMN1 (stathmin 1), APOL2 (apolipoprotein L2), ALDH1A3 (aldehyde dehydrogenase 1 family member A3), et S100A10 (S100 calcium binding protein A10) sont retrouvés sur-exprimés dans l'endomètre réceptif dans au moins une des six études transcriptomiques (Díaz-Gimeno *et al.*, 2011 ; Haouzi *et al.*, 2009a ; Mirkin *et al.*, 2005 ; Riesewijk *et al.*, 2003 ; Talbi *et al.*, 2006) et corrélient avec l'une des trois études protéomiques (Domínguez *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2011). MAOA est un candidat particulièrement intéressant car la diminution de l'expression de ses ARNm et protéique est associée à un échec d'implantation (Henriquez *et al.*, 2006 ; Tapia *et al.*, 2008). De même, TAGLN a récemment été identifié comme une cible directe de la migration épithéliale dépendante de la voie TGF- β /Smad 3, connue pour jouer un rôle dans le processus implantatoire (Haouzi *et al.*, 2009b ; Jones *et al.*, 2006). Cependant, les fonctions de la majorité de ces gènes dans la réceptivité de l'endomètre ne sont pas connues. D'autre part, une sur-expression des ARNm de APOL2 a été observée dans les cellules endothéliales de cordon ombilical après stimulation par TNF α , une cytokine jouant un rôle clé dans les

processus précoces implantatoires (Nimbkar-Joshi *et al.*, 2009). Chez le Singe rhésus, une expression spécifique de la protéine S100A10 a été rapportée au niveau du site d'implantation (Sun *et al.*, 2004). Ces résultats sont en accord avec l'une des fonctions de la protéine S100A10 comme ligand de l'annexine A2 (ANX2), protéine récemment rapportée comme bio-marqueur de la réceptivité de l'endomètre (Domínguez *et al.*, 2009).

4.3 Réceptivité endométriale et stimulation ovarienne

La réceptivité de l'endomètre suite à une stimulation ovarienne est une préoccupation majeure en AMP. Les protocoles agonistes et antagonistes à la GnRH sont associés à un avancement de la maturation de l'endomètre, évaluée selon les critères histologiques de Noyes (Barash *et al.*, 1992 ; Kolibianakis *et al.*, 2002 ; Noci *et al.*, 1997 ; Saadat *et al.*, 2004). Cet avancement est probablement à l'origine d'une désynchronisation entre le stade de développement de l'embryon et le stade de maturité de l'endomètre.

Dans le cadre de l'AMP, l'appréciation de la réceptivité endométriale des patientes permettrait d'optimiser les succès des transferts embryonnaires. Pourtant, peu d'outils médicaux d'appréciation de la réceptivité endométriale sont actuellement mis à la disposition des cliniciens.

Des études transcriptomiques ont permis d'étudier les impacts des différents protocoles de stimulation sur la réceptivité endométriale. Les profils transcriptomiques endométriaux de patientes en cycle naturel ont ainsi été comparés à ceux de patientes en cycle stimulé (Horcajadas *et al.*, 2005 ; Horcajadas *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2008 ; Mirkin *et al.*, 2004 ; Simon *et al.*, 2005). Seule une étude a comparé ces différences chez des mêmes patientes, c'est-à-dire au cours d'un cycle naturel puis d'un subséquent cycle stimulé chez chaque patiente dans une cohorte de 21 patientes, et ce, indépendamment du protocole de stimulation utilisé (Haouzi *et al.*, 2009b). Toutes ces études s'accordent sur le fait que les profils transcriptomiques des endomètres prélevés pendant la fenêtre théorique d'implantation sous traitement de stimulation ovarienne différaient des profils transcriptomiques en cycle naturel. Haouzi *et al.* (2009b) ont montré que les protocoles de stimulation ovarienne affectaient la réceptivité de l'endomètre, soit de façon modérée (85%) soit sévèrement (15%). D'une façon générale, les protocoles de stimulation ovarienne induisent un avancement prématuré des endomètres pré-réceptifs sécrétoires, délétère pour l'implantation lorsque cet avancement excède 3 jours. Cet effet délétère est probablement associé à la désynchronisation entre le degré de maturité de l'endomètre et celui de l'embryon (Haouzi *et al.*, 2014). De plus, les protocoles d'antagonistes à la GnRH permettraient d'obtenir un profil

transcriptomique de la réceptivité endométriale plus proche de celui observé en cycle naturel en comparaison de ceux obtenus sous protocoles agonistes (Haouzi *et al.*, 2010 ; Simon *et al.*, 2005).

Une cause possible de l'avancement de la maturation de l'endomètre serait les hauts taux de concentration de la progestérone à la fin de la phase folliculaire. En effet, lors de cycles de stimulation, l'élévation prématurée de la progestérone à la fin de la phase folliculaire semble être associée avec des taux de grossesses diminués (Bosch *et al.*, 2003 ; Bosch *et al.*, 2010). Cette élévation prématurée est probablement causée par l'hyperstimulation des ovaires, mais les causes sont encore incertaines. L'effet de la progestérone sur la réceptivité endométriale n'est pas surprenant comme les modifications de la phase sécrétoire sont principalement contrôlées par cette hormone. L'effet de haut taux d'œstrogènes sur la réceptivité endométriale est moins évident. Certaines études ont montré que des taux élevés d'œstrogènes étaient liées avec des taux d'implantation diminués (Simón *et al.*, 1995 ; Pellicer *et al.*, 1996), alors que d'autres études n'ont pas mesuré de lien entre ce paramètre et le succès de la FIV (Papageorgiou *et al.*, 2002 ; Peña *et al.*, 2002). Les taux élevés d'œstrogènes provoquent un retardement de maturation des glandes endométriales en même temps qu'un avancement de maturation des cellules stromales, ce défaut de la transition sécrétoire pourrait expliquer la diminution des taux d'implantation (Basir *et al.*, 2001). Les effets des taux supra-physiologique de la progestérone et des œstrogènes demeurent à être étudiés plus en profondeur.

4.4 Tests diagnostiques de la réceptivité endométriale

4.4.1 Win-Test

En utilisant une approche transcriptomique, notre équipe a identifié des gènes différentiellement exprimés entre les échantillons d'endomètres pré-réceptifs (LH+2) et réceptifs (LH+7) de la phase sécrétoire chez 31 patientes en cycle naturel et ce, au sein d'un même cycle naturel (n=62 échantillons) (Haouzi *et al.*, 2009a). Nous avons intersecté la liste de gènes significativement modulés entre les échantillons d'endomètres pré-réceptifs et réceptifs avec celles des autres études comparant les mêmes phases du cycle menstruel (Carson *et al.*, 2002 ; Díaz-Gimeno *et al.*, 2011 ; Mirkin *et al.*, 2005 ; Riesewijk *et al.*, 2003 ; Talbi *et al.*, 2006 ; Haouzi *et al.*, 2009a). Cette méta-analyse a permis d'identifier des gènes (797) spécifiquement modulés dans l'endomètre réceptif et exclusif à notre étude : 746 sur-exprimés et 51 sous-exprimés (Haouzi *et al.*, 2012 ; Haouzi *et al.*, 2009a ; Haouzi *et al.*, 2009b). Simultanément, un algorithme mathématique de prédicteur de classe appliqué aux données de puce à ADN a permis d'identifier des marqueurs prédictifs de la réceptivité endométriale (54 gènes). L'intersection des gènes

exclusifs à notre étude, avec les marqueurs prédictifs d'un endomètre réceptif a permis de sélectionner un panel de 11 gènes afin de mettre en place un test d'appréciation de la réceptivité endométriale (figure 7 et tableau 1).

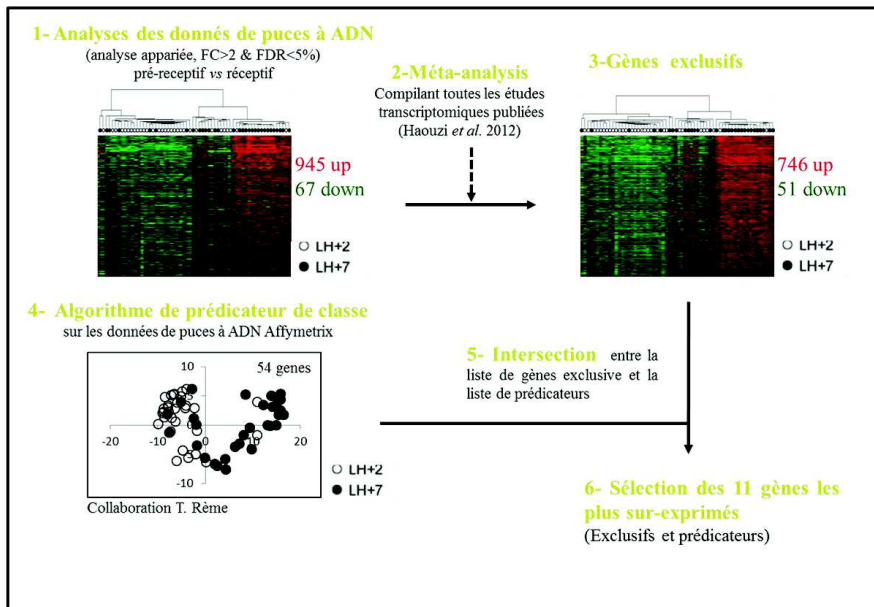


Figure 7 Étapes de la sélection des bio-marqueurs de la réceptivité endométriale

Analyses des données de puces à ADN, 2) méta-analyse, 3) identification d'une signature exclusive à notre étude, 4) application d'un algorithme de prédicateur de classe sur nos données de puces à ADN, 5) intersection des gènes exclusifs et de la liste de prédicateur, et 6) sélection des 11 gènes.

Ces 11 gènes sont tous fortement sur-exprimés pendant la fenêtre d'implantation et sont impliqués dans le remodelage de la MEC, l'angiogenèse et la formation de la fenestration endothéliale (Haouzi *et al.*, 2009a).

Symbole	Nom du gène
MFAP5	Microfibrillarassociatedprotein 5
ANGPTL1	Angiopoietin-like 1
PROK1	Endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor or prokineticin 1
NLF2	Nuclear localized factor 2 or C2 calcium-dependent domain containing 4B
LAMB3	Laminin, beta 3
BCL2L10	BCL2-like 10
CD68	CD68 antigen
TRPC4	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4
SORCS1	Sortilin-related VPS10 domain containing receptor 1
FST	Follistatin
KTR80	Keratin 80
IL15	Interleukin 15
SPP1	Secretedphosphoprotein 1

Tableau 1 Liste des gènes sélectionnés

Ce test d'appréciation de la réceptivité endométriale, appelé Win-Test (**Window Implantation Test**) consiste à mesurer l'expression des ARNm de ces 11 candidats par RT-PCR quantitatif (qPCR) (Brevet INSERM BIO 10260; EP10305561.2; PCT/EP2011/058757) (Haouzi *et al.*, 2009a). Comme SPP1 et IL15 sont les deux seuls gènes retrouvés sur-exprimés pendant la fenêtre d'implantation par les 6 études transcriptomiques, nous avons inclus ces gènes au Win-Test. L'évaluation de l'expression de ce panel de 13 gènes, spécifiques de la réceptivité endométriale humaine, permet de classer un échantillon endométrial prélevé pendant la fenêtre d'implantation, en cycle naturel ou sous THS, de 'réceptif', 'partiellement réceptif' ou 'non-réceptif'. D'autre part, la stratégie de remplacement des embryons en fonction du résultat du Win-Test consiste à cibler une meilleure synchronisation du dialogue entre l'endomètre et l'embryon et ce, en déterminant le jour optimal de réceptivité endométriale. Dans le respect de cette synchronisation de dialogue, un blastocyste (J5) sera donc transféré lorsque l'endomètre est dit réceptif, un embryon J2 ou J3 devra être replacé lorsque l'endomètre est partiellement réceptif offrant ainsi la possibilité à l'endomètre et l'embryon de finir leur maturation ensemble. Des études multicentriques sont actuellement en cours afin de juger de la pertinence de ce test.

4.4.2 Endometrial receptivity array

Díaz-Gimeno *et al.* (2011) ont identifié une liste de 238 gènes différentiellement exprimés entre l'endomètre pré-réceptif *versus* réceptif. Ils ont développé une puce à ADN Agilent personnalisée et commercialisée sous le nom d'ERA (Endometrial Receptivity Array). Le test ERA consiste à analyser l'expression de ces 238 gènes à partir d'une biopsie de l'endomètre prélevée pendant la fenêtre théorique d'implantation, de six à huit jours après l'ovulation. Si le test est 'réceptif', le transfert d'embryon aura lieu pendant un cycle menstruel ultérieur, au jour correspondant. Lorsqu'il est dit 'non-réceptif', le résultat est alors décrit comme post ou préimplantatoire, et un autre test doit être effectué lors du cycle suivant en tenant compte de ces indications afin d'identifier la fenêtre d'implantation. En 2013, le test ERA a été pratiqué sur 85 volontaires ayant expérimenté en moyenne 5 FIV infructueuses. Les chercheurs ont obtenu 19 grossesses, soit un taux de réussite de 20%, proche de la moyenne française et donc important, compte tenu des précédents échecs de la population testée (Díaz-Gimeno *et al.*, 2014). Environ 25% des patientes avaient une fenêtre d'implantation déplacée, contre seulement 12% dans un groupe témoin. Ces résultats ont été confirmés en 2014: les chercheurs ont guidé les FIV de 17 personnes à l'aide du test ERA. Celles-ci avaient rencontré entre un et six échecs d'implantation, et

neuf d'entre elles ont été enceintes à la suite de cette expérience, soit un taux de succès de plus de 50 % (Díaz-Gimeno *et al.*, 2014). Depuis fin 2014, une étude multicentrique incluant 2500 patientes à travers 10 pays est en cours afin de juger de la relevance clinique de ce test d'appréciation de la réceptivité endométriale.

4.5 Test diagnostique du profil immunologique de l'endomètre

Une équipe française, offre aussi un test diagnostique endométriale selon une évaluation du profil immunitaire de l'endomètre pendant la fenêtre d'implantation : MatriceLAB Innove (Lédée *et al.*, 2011). En effet, un défaut ou, au contraire, une activité immunitaire locale excessive, peut aboutir à l'échec de l'implantation embryonnaire. Trois analyses sont appliquées au prélèvement endométrial: 1) une datation histologique, 2) le compte des cellules uNK, et 3) l'expression des ARNm des cytokines suivantes par qPCR: l'IL15, TWEAK (tumor necrosis factor weak inducor of apoptosis) et l' IL18. En effet, un débalancement de ces paramètres est relié à des échecs d'implantation ou des fausses couches précoces (Lédée-Bataille *et al.*, 2005). Les échantillons endométriaux sont classifiés en profil immunitaire normal, sous ou suractivé. La sous-activation endométriale est caractérisée par une insuffisance de sécrétions des cytokines (expression base de l'IL18 et TWEAK), une migration insuffisante et immaturité des cellules uNK (faible expression de l'IL15). La sur-activation endométriale est caractérisée par une migration excessive des cellules uNK, un excès d'expression des cytokines, activant les uNK en lymphocytes killer activés ainsi qu'à un défaut d'immunorégulation locale (Lédée *et al.*, 2011).

4.6 Transfert embryonnaire personnalisé

Ces tests diagnostiques de la réceptivité endométriale ont un grand potentiel d'application clinique pour la prise en charge des patientes en AMP. Les tests d'appréciation de la réceptivité endométriale actuellement proposés (Win-Test, ERA) permettent de cibler un transfert d'embryon(s) personnalisé en identifiant pour chaque patiente le moment précis où l'endomètre est réceptif. Ceci permet de synchroniser le dialogue entre l'embryon et l'endomètre et d'augmenter les taux de grossesses suite au transfert d'embryon(s) vitrifié(s) et réchauffé(s). Ainsi, un blastocyste sera transféré au moment où l'endomètre est réceptif, un embryon J3 ou J2 sera transféré environ 48 ou 72 heures avant que l'endomètre soit réceptif, respectivement.

5. Analyse fonctionnelle d'un bio-marqueur de la réceptivité endométriale

Lorsque j'ai intégré l'unité de recherche, une étude protéomique globale sur des échantillons d'endomètres venait d'être effectuée. Ces travaux sont rapportés dans le chapitre 2 de ce manuscrit. Cependant il convient de présenter dans cette section la protéine d'intérêt de cette étude.

La cohorte étudiée concernait des tissus d'endomètres, prélevés au cours des phases pré-réceptive et réceptive sécrétoire au sein d'un même cycle naturel chez des mêmes patientes prises en charge pour un problème d'infertilité masculine. La technologie SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption - Time Of Flight) a été utilisée afin de comparer les profils des protéines dans les tissus endométriaux entre ces deux phases du cycle menstruel. Deux pics de protéines significativement différenciellement exprimés entre les deux phases endométriales ont été identifiés (7.5kDa, 4.5kDa), les pics étant sur-exprimés dans l'endomètre réceptif. Les protéines présentes dans ces pics d'intérêts ont été identifiées par spectrométrie de masse. Nos analyses protéomiques nous ont permis d'identifier 216 protéines. Ces nouvelles données ont été comparées à nos données transcriptomiques comparant les mêmes phases de cycles (Haouzi *et al.*, 2009a). Nous avons ainsi sélectionné seize bio-marqueurs dont les ARNm et protéines sont sur-exprimés pendant la fenêtre d'implantation. Parmi ces candidats, quatre appartiennent à la famille de protéine S100. Après une revue de la littérature, nous avons choisi de nous intéresser au rôle de la protéine S100A10 dans le processus d'acquisition de la réceptivité endométriale et de l'implantation.

5.1 Famille S100

S100A10 appartient à la famille de protéines S100 faisant parti de la super-famille des « EF-Hand ». Le « EF-Hand » est un motif structural constitué de deux hélice- α reliées par une boucle. Certains résidus hydrophiles de la boucle se fixent à un ion Ca^{2+} par des liaisons ioniques. La famille S100 comprend 24 membres qui sont exclusivement exprimés chez les vertébrés (Donato *et al.*, 2013). Chez l'homme, la majorité des gènes des protéines S100 sont regroupés dans la région 1q21 du chromosome 1 et sont divisés en deux sous-groupes : S100A1-9, 12-16 et S100A10-11, ces deux sous-groupes sont séparés par quelques méga-bases. Les protéines S100 sont localisées dans le cytoplasme et/ou le noyau de nombreux types cellulaires. Les gènes de la famille S100 exercent des fonctions extracellulaire, intracellulaire, ou parfois les deux (Donato *et al.*, 2013). Ils sont impliqués dans la réponse immunitaire, la différenciation, la régulation de la prolifération, la dynamique du cytosquelette, l'apoptose, l'activité enzymatique, l'homéostasie du Ca^{2+} et la migration/invasion (Donato *et al.*, 2013). Ces protéines de

faibles masses moléculaires (9 à 14kDa) possèdent 2 sites de fixation pour le calcium de type « EF-hand ». Le motif du côté C-terminal est commun à toutes les protéines de la superfamille des « EF-Hand », alors que le motif du côté N-terminal est unique à la famille S100 (Donato, 2003). Le motif C-terminal est composé de 12 acides aminés et possède une affinité élevée au calcium, alors que le motif en N-terminal (le motif « EF-hand » spécifique des protéines S100) est composé d'une séquence de 14 acides aminés et possède une affinité avec le calcium 10-50 fois plus faible (Donato *et al.*, 2013). Les protéines de la famille S100 forment des homo ou hétéro dimères. L'association des dimères au Ca^{2+} provoque un changement de conformation qui expose les surfaces hydrophobiques des dimères, ceci permet aux dimères d'interagir avec des protéines cibles. Ainsi, les protéines S100 répondent aux augmentations intracellulaires de Ca^{2+} par leur association aux protéines cibles et elles modulent ainsi les activités de ces protéines. D'ailleurs, l'expression de plusieurs protéines de cette famille est associée à de nombreux cancers (Eckert *et al.*, 2004 ; Tanaka *et al.*, 2015 ; Bresnick *et al.*, 2015).

5.2 S100A10

S100A10 (appelée aussi p11 ou annexin light chain) est une petite protéine de 11kDa. S100A10 est une exception de la famille S100 car son site de liaison avec le calcium est inactif suite à des mutations dans les deux motifs « EF hand ». Malgré ces mutations, S100A10 a conservé la structure tridimensionnelle correspondant aux protéines S100 associées au calcium, S100A10 conserve ainsi un statut actif en permanence (Kube *et al.*, 1992). S100A10 est retrouvée dans de multiples types cellulaires, avec une expression protéique forte dans les poumons, les intestins et le foie. Cette protéine est majoritairement retrouvée liée à l'annexine A2 (ANX2), elles forment un complexe AIt hétéro-tétramère stable composé d'un dimère de S100A10 et de 2 molécules d'ANX2. Le site de liaison au S100A10 se situe sur les 14 premiers résidus du domaine N-terminal de l'ANX2. L'ANX2 est impliquée dans plusieurs activités cellulaires, telles que le trafic intercellulaire (endocytose et exocytose), la stabilisation et formation des micro-domaines lipidiques nécessaires à l'exocytose, la régulation du cytosquelette et la formation de jonctions cellulaires (Grieve *et al.*, 2012 ; Harder et Gerke, 1993). S100A10 est une protéine cytosolique intracellulaire, mais le complexe AIt se trouve dans les régions sub-membranaires des cellules (Zobiack *et al.*, 2001). Le complexe AIt sert de partenaire extracellulaire pour des pathogène et des protéines.

De nombreuses fonctions sont attribuées à la protéine S100A10 : 1) c'est un régulateur du réseau d'actine (Jung *et al.*, 2010), 2) elle est impliquée dans la production de plasmine et l'invasion des macrophages (O'Connell *et al.*, 2010), ainsi que dans 3) le trafic de protéines vers la membrane plasmique (Umbrecht-Jenck *et al.*, 2010). En vue de ces fonctions, cette protéine S100A10 joue un rôle

crucial dans le processus d'inflammation (Godier et Hunt, 2013) et en carcinogénèse (Liu *et al.*, 2008 ; McKiernan *et al.*, 2011).

5.2.1 Rôles de S100A10

5.2.1.1 Régulation de l'actine

L'actine est une protéine impliquée dans la migration, l'adhésion, la régulation et la maintenance de l'architecture du cytosquelette et de la membrane cellulaire. Ainsi, une dérégulation de la polymérisation du monomère de filaments d'actine affecte la mobilité cellulaire. Il a été montré qu'une sous-expression par petits ARNs interférant (siARN) de S100A10 entraîne une désorganisation des filaments d'actine réduisant ainsi la migration cellulaire (Jung *et al.*, 2010). Aussi, S100A10 est nécessaire à l'étalement des cellules via l'activation de Rac1, une GTPase jouant un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette (Sayeed *et al.*, 2013). Subséquemment, S100A10 participe à la régulation du réseau d'actine affectant ainsi l'invasion et la migration cellulaire.

5.2.1.2 Production de plasmine

D'autre part, S100A10 est un récepteur cellulaire du plasminogène. Le complexe A11t possède un résidu de lysine en carboxy-terminal qui se lie aux tPA et aux plasminogènes, des pro-enzymes inactives, entraînant la conversion protéolytique des plasminogènes en plasmines. Des macrophages isolés chez des souris transgéniques S100A10^{-/-} ont montré une capacité d'invasion réduite en culture *in vitro* dans du matrigel (matrice extracellulaire isolée à partir de sarcome murin), sans modifier leur capacité de migration (O'Connell *et al.*, 2010).

La formation de plasmines à la surface des cellules est nécessaire pour le recrutement des macrophages. Ces macrophages jouent deux rôles dans l'invasion en hydrolysant la MEC et activent d'autres protéines qui dégradent aussi la MEC permettant ainsi l'invasion de la MEC (O'Connell *et al.*, 2010).

5.2.1.3 Trafic de protéine

Le complexe A11t est localisé aux sites de contact de la membrane plasmique et des vésicules de sécrétions, suggérant un rôle dans l'exocytose, un processus permettant aux cellules de sécréter des signaux chimiques (Umbrecht-Jenck *et al.*, 2010). En effet, S100A10 interagit avec plusieurs sous-unités de canaux ioniques et joue un rôle dans la régulation du trafic des protéines au niveau de la membrane plasmique (Girard *et al.*, 2002 ; Poon *et al.*, 2004 ; Renigunta *et al.*, 2006 ; Svenningsson *et al.*, 2006). Par exemple, S100A10 intervient lors de la mise en place des sites d'exocytose par une interaction avec VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2), une protéine transmembranaire SNARE (Soluble N-

éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor), afin de recruter l'ANX2 et former des microdomaines lipidiques nécessaire à l'exocytose (Umbrecht-Jenck *et al.*, 2010). Les SNAREs sont les principaux responsables du trafic membranaire.

5.2.2 S100A10 en fertilité

Le gène *S100A10* est sur-exprimé dans l'endomètre humain pendant la fenêtre d'implantation (Haouzi *et al.*, 2009b ; Wei *et al.*, 2014). Sa sur-expression protéique pendant la fenêtre d'implantation a été identifiée dans cette présente étude protéomique ainsi que dans l'étude de Domínguez *et al.* (2009). De plus, une sur-expression spécifique de la protéine S100A10 au niveau des sites d'implantation a été rapportée chez le singe rhésus (Sun *et al.*, 2004). Ces résultats sont en accord avec l'une des fonctions de la protéine S100A10 comme ligand de l'ANX2, protéine récemment rapportée comme bio-marqueur de la réceptivité de l'endomètre (Domínguez *et al.*, 2009). Récemment, un article chinois a confirmé la sur-expression de S100A10 pendant la fenêtre d'implantation, avec une expression principalement cytoplasmique et cytomembranaire de l'épithélium luminal et glandulaire de l'endomètre humain. Cette protéine est exprimée de façon continue pendant les phases proliférative et sécrétoire, avec une expression plus forte pendant la phase mi-sécrétoire (Wei *et al.*, 2014).

6. Contexte des problématiques abordées

L'acquisition du phénotype de la réceptivité endométriale est l'un des facteurs clé permettant l'implantation réussie d'un embryon. Ce processus biologique hautement complexe n'est toujours pas, à ce jour, complètement élucidé. Pourtant, le besoin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires permettant l'acquisition du phénotype de la réceptivité endométriale est crucial afin de guider les techniques d'AMP pour en améliorer les taux de succès. Les problématiques dans le domaine de la réceptivité endométriale sont diverses, nous avons choisi de nous concentrer sur quatre d'entre elles.

Dans un premier temps, des études protéomiques et transcriptomiques endométriales, nous ont permis de sélectionner un bio-marqueur sur-exprimé pendant la fenêtre d'implantation, et par conséquent, potentiellement impliqué dans le processus d'implantation embryonnaire. De multiples études se sont intéressées à l'identification de bio-marqueurs de la réceptivité endométriale par des approches Omics (Altmäe *et al.*, 2014.). Cependant peu ont approfondi leur étude afin de déterminer les rôles et fonctions précis de ceux-ci pendant la fenêtre d'implantation. L'objectif de notre étude était d'identifier des

fonctions de ce bio-marqueur dans le processus d'implantation, et plus particulièrement dans le phénotype d'acquisition de la réceptivité endométriale, par une approche fonctionnelle.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la réceptivité endométriale en cycle naturel. Car, seulement 32% des transferts embryonnaire résultent en une grossesse (ESHRE, 2011). Plusieurs avancées ont eu lieu dans les dernières décennies dans le domaine de l'AMP, particulièrement au niveau des milieux de culture permettant la culture prolongée des embryons jusqu'au stade de blastocyste. Par contre, la réceptivité endométriale est une composante majeure qui a été négligée. Ces dernières années, les tests de la réceptivité endométriale, le Win-Test et ERA, ont permis de mieux cerner le processus de la réceptivité endométriale (Haouzi *et al.*, 2012 ; Gomez *et al.*, 2015). Ces études ont montré que contrairement à la croyance dans le domaine, la fenêtre d'implantation n'est pas fixe, mais varie dans la durée et le moment de son apparition d'une patiente à une autre (Blesa *et al.*, 2014). Ainsi le transfert embryonnaire systématique pendant la fenêtre d'implantation théorique est une pratique qui demande à être révisée. Un transfert embryonnaire personnalisé permet de s'assurer de la synchronisation des développements embryonnaire et endométriale : l'apparition exacte de la fenêtre d'implantation de la patiente est validée par une analyse moléculaire et le transfert est orchestré selon le stade de développement de l'embryon. Ainsi un blastocyste (J5) est transféré lorsque l'endomètre est réceptif alors qu'un embryon J2 ou J3 est plutôt transféré lorsque l'endomètre est partiellement réceptif, c'est à dire 72 et 48h avant que l'endomètre soit réceptif respectivement. Dans le cadre de ma thèse, d'abord nous avons mis en place le Win-Test dans le laboratoire du département de Recherche & Développement d'OVO. Ceci nous a permis ensuite d'étudier la prévalence d'endomètres réceptifs, partiellement réceptifs et non-réceptifs pendant la fenêtre théorique d'implantation (LH+7 à LH+9) en cycle naturel de patientes suivies à la clinique OVO, au Canada. Ces données nous permettrons de confirmer les résultats de l'unité de recherche U1203 de Montpellier par rapport à l'hétérogénéité du moment d'apparition de la fenêtre d'implantation. Ce projet est d'autant plus intéressant qu'il s'agit d'une population géographique et ethnique différente. Le Win-Test étant bien implanté à Montpellier, la validation de ce test d'appréciation de la réceptivité endométriale dans une autre clinique d'AMP est une étape importante de la commercialisation. De plus, il est intéressant de mettre en place la distribution de ce test en Amérique du Nord.

Les taux de grossesse suivant la FIV/ICSI peuvent être influencés selon le taux la progestérone plasmatique, le jour de l'administration de l'hCG, ainsi nous nous sommes intéressés à cette

problématique dans le cadre de notre troisième étude. Une hyperprogestéronémie en fin de phase folliculaire sous protocole de stimulation est principalement liée aux doses de FSH utilisées et est corrélée au nombre de follicules recrutés et au taux d'estradiol (Hugues, J. N., 2012). En effet, les cellules de la granulosa de chaque follicule produisent une quantité régulière de progestérone, causant un taux total très élevé de cette hormone en fin de phase folliculaire (Venetiset *al.*, 2013 ; Bosch *et al.*, 2010). L'hyperprogestéronémie provoque une maturation prématurée de l'endomètre qui amène une désynchronisation entre le développement de l'embryon et de l'endomètre (Papanikolaou *et al.*, 2009). L'impact d'une élévation précoce de la progestérone sur les résultats cliniques reste controversé. Pour les transferts à J3, des études ont rapporté une diminution des taux de grossesses (Bosch *et al.*, 2003, 2010 ; Li *et al.*, 2008 ; Papanikolaou *et al.*, 2009 ; Kolibianakis *et al.*, 2012 ; Santos-Ribeiro *et al.*, 2014) alors que d'autres études n'ont pas révélé d'impact (Edelstein *et al.*, 1990 ; Bustillo *et al.*, 1995 ; Hofmann *et al.*, 1996 ; Moffitt *et al.*, 1997 ; Martínez *et al.*, 2004 ; Saadat *et al.*, 2004 ; Venetis *et al.*, 2007 ; Saleh *et al.*, 2009 ; Chang *et al.*, 2011 ; Ochsenkühn *et al.*, 2012). Les différentes valeurs seuils de progestérone utilisées pour déterminer cette hyperprogestéronémie pourraient expliquer une partie de la disparité des résultats rapportés. Cependant, des valeurs seuils supérieur à 1,5 ng/ml ou inférieur à 0,5 ng/ml sont établis comme ayant un effet délétère sur les taux de grossesses variant de 10 à 35 % dans le cadre de transferts d'embryons J3 (Bosch *et al.*, 2010). Cet effet délétère est associé à un avancement prématuré de la maturation endométriale pendant la phase péri-ovulatoire (pré-réceptive) selon les critères de Noyes, provoquant ainsi une désynchronisation du dialogue entre l'endomètre et le stade de développement embryonnaire. Par contre, dans le cadre de transfert d'embryons J5, la littérature est beaucoup plus mitigée puisque certaines études rapportent un effet délétère de l'ordre de 10 % sur les taux de grossesse (Santos-Ribeiro *et al.*, 2014; Ochsenkühn *et al.*, 2012), d'autres au contraire n'observent aucun effet délétère (Papanikolaou *et al.*, 2009; Ochsenkühn *et al.*, 2012). En vue de ces observations et dans le cas où l'option de la culture prolongée n'est pas envisageable, la stratégie du 'freeze all' pour les embryons J3 est recommandée. Par contre, la question de transférer ou non au stade blastocyste reste d'actualité. En vu des résultats cliniques rapportés, on est en droit de se demander s'il existe une preuve moléculaire de cet avancement prématuré de la maturation endométriale chez des patientes présentant une progestéronémie élevée le jour de l'administration de l'hCG ? D'autre part, que savons-nous réellement du statut de l'endomètre pendant la fenêtre théorique d'implantation chez ces patientes ? Pour répondre à ces questions, nous avons comparé par des analyses transcriptomiques la transition du profil d'expression des gènes de la phase pré-réceptive à la phase réceptive d'endomètres

de patientes avec des taux normaux de progestérone à ceux de patientes avec des taux élevés de progestérone le jour de l'hCG. D'autre part, nous avons utilisé le Win-Test afin d'étudier l'impact de l'élévation de la progestérone sur la réceptivité endométriale.

Notre quatrième étude porte sur la réceptivité endométriale dans le cadre de THS. Ces traitements sont utilisés en AMP lors de transfert d'embryon(s) cryo-préservé(s), ainsi que lors de dons d'ovocytes. Dans les dernières années, le nombre de THS a largement augmenté, vu l'amélioration des techniques de laboratoire qui permet d'obtenir plus d'embryons de qualité et la tendance de transférer moins d'embryons afin de diminuer les risques de grossesses multiples (Groenewoud *et al.*, 2013). Cependant, les taux de grossesses sont généralement inférieurs à ceux de transfert frais : 23% *versus* 32% selon l'ESHRE (2011). En effet, des études ont montré que les THS ont un impact délétère morphologique sur l'endomètre, causant une désynchronisation entre la différenciation des glandes et du stroma décidualisé en phase mi-lutéale (Deligdisch, 1993 ; Noci *et al.*, 1997). De nombreuses études ont analysé les résultats cliniques selon la durée, les doses et le type d'administration de la prise de progestérone et des oestrogènes ainsi que l'injection ou non d'hCG, pourtant aucune évidence permet de croire qu'un traitement serait plus bénéfique qu'un autre (Van der Linden *et al.*, 2011). Cependant la durée de l'administration de la progestérone semble être le facteur le plus critique. Les effets des THS sur la réceptivité endométriale d'un point de vue moléculaire ont été très peu explorés. Ainsi nous avons choisi d'étudier l'expression globale des gènes pendant la fenêtre d'implantation de patientes sous THS en attente de don d'ovocytes, et de vérifier la réceptivité endométriale par le biais du Win-Test. De plus, nous rapportons les résultats de grossesses à la suite de transferts embryonnaire personnalisés, complétés selon l'évaluation de la réceptivité endométriale de chaque patiente.

Chapitre 2 Human S100A10 plays a crucial role in the acquisition of the endometrial receptivity phenotype

Laurence Bissonnette^{a,b,c,d}, Loubna Drissenek^{a,b,c}, Yannick Antoine^{a,b,c}, Laurent Tiers^b, Christophe Hirtz^{b,c},
Sylvain Lehmann^{b,c}, Hélène Perrochia^e, François Bissonnette^d, Isaak J. Kadoch^d, Delphine Haouzi^{a,b,c,*},
Samir Hamamah^{a,b,c,f,*}.

^aINSERMU1203 'Développement embryonnaire précoce humain et pluripotence', Hôpital Saint-Eloi, Montpellier, F-34295 France; ^bCHU Montpellier, Institut de Médecine Régénératrice et de Biothérapie, Hôpital Saint-Eloi, Montpellier, F-34295 France; ^cUniversité Montpellier1, UFR de Médecine; ^dOVO Fertility, 8000 Boulevard Decarie #100, Montréal, Québec, Canada H4P 2S4; ^eCHU Montpellier, Hôpital Gui de Chauliac, Service Anatomie cytologie pathologiques, Montpellier, F-34295 France; ^fCHU Montpellier, Département de Biologie de la Reproduction et du DPI, Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, F-34295 France.

^gcorresponding authors

Pr. Samir Hamamah, Delphine Haouzi

ART/PGD Department, Arnaud de Villeneuve Hospital,

Inserm U1203

34295 Montpellier, France

Tel: 04 67 33 64 04

Fax: 04 67 33 62 90

e-mails: s-hamamah@chu-montpellier.fr, delphine.haouzi@inserm.fr

submitted (Cell Adhesion & Migration)

Abbreviations

8-Br-cAMP, 8-bromoadenosine 3':5'-cyclic monophosphate; COL, collagen; CX43, connexin 43; DCN, decorin; ECM, extracellular matrix; FBS, foetal bovine serum; FDR, false discovery rate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HEECs, human endometrial epithelial cells; HESCs, human endometrial stromal cells; IVF, *in vitro* fertilization; ICSI, intra-cytoplasmic sperm injection; LC, liquid chromatography; LH, luteinizing hormone; MMP, matrix metalloproteinase; MS/MS, tandem mass spectrometry; PRL, prolactin; RIF, repeated implantation failure; S100A10, S100 calcium binding protein A10; S100A11, S100 calcium binding protein A11; SDS, sodium dodecyl sulphate; SELDI-TOF, Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight; shRNA, short hairpin RNA.

Abstract

In assisted reproduction, about 2/3 of embryo implantation failures are related to inadequate endometrial receptivity. To identify molecules involved in endometrial receptivity acquisition, we investigated, using a SELDI-TOF approach, the protein expression profile of early-secretory and mid-secretory endometrium samples. Among the proteins up-regulated in mid-secretory endometrium, we investigated the function of S100A10 in endometrial receptivity and implantation process. S100A10 was expressed in epithelial and stromal cells of the endometrium of fertile patients during the implantation windows. Conversely, it was down-regulated in the mid-secretory endometrium of infertile patients diagnosed as non-receptive. Transcriptome analysis of human endometrial epithelial and stromal cells where S100A10 was silenced by shRNA revealed the deregulation of 37 and 256 genes, respectively, related to components of the extracellular matrix and intercellular connections. Functional annotations of these deregulated genes highlighted alterations of the leukocyte extravasation signalling and angiogenesis pathways that play a crucial role during implantation. S100A10 silencing also affected the migration and decidualization of primary endometrial epithelial and stromal cells, and promoted apoptosis in serum-starved endometrial epithelial cells. Our findings identify S100A10 as a player in endometrial receptivity acquisition.

Key words: Human, endometrial receptivity, S100A10, early implantation, proteome

Introduction

Understanding the molecular mechanisms involved in the acquisition of the endometrial receptivity phenotype is important in assisted reproductive technology (ART). Indeed, around 2/3 of implantation failures are related to inadequate endometrial receptivity. Different gene array studies have determined the mRNA changes during the menstrual cycle.^{1,2} However, biological processes, including the acquisition of the endometrial receptivity phenotype, are ultimately controlled by proteins and therefore analysis of the changes in the protein profile is required to acquire a complete overview. Indeed, the overall lack of correlation between gene and protein expression data on endometrial receptivity² underlines the importance of post-transcriptional or translational regulations for the acquisition of the receptive phenotype during the implantation window. Nevertheless, studies on endometrium receptivity using high-throughput mass spectrometry-based proteomic approaches are still scarce (Table 1). So far, only four studies compared the endometrial protein expression profiles between the mid- or late-proliferative and mid-secretory stages.³⁻⁶ However, the reported protein profiles were completely different, although similar endometrial samples were compared. Similarly, two other studies that compared the endometrium proteome during the transition from the early-secretory to the mid-secretory stage did not highlight any shared protein.^{7,8} Many factors could justify these disparities (different proteomic approaches, recruited patients, number of samples, statistical methodologies).^{2,9} Particularly, the endometrial sample size was generally low (Table 1) and the clinical populations were mostly not well defined. Moreover, few studies analysed the protein profile changes between early-secretory and mid-secretory endometrium in the same patients and in a large cohort of patients, to minimize the inter-patient variability.^{1,2,9} In addition to sufficiently powered studies, validation of selected proteins in an independent cohort of patients remains a key step, which is not always performed.⁹ Moreover, the determination of the function(s) of selected proteins remains indispensable for understanding the signalling pathways controlling human endometrial receptivity.

The aim of the present study was to perform a comparative proteomic analysis of endometrium samples collected at the early-secretory and mid-secretory stages from the same normal responder patients undergoing natural cycle. The differential expression of two selected candidates (S100A10 and S100A11) in independent endometrium samples was then validated by western blotting, RT-qPCR and/or immunofluorescence. Then, S100A10 was selected for functional analyses in primary human endometrial cells (Fig. 1).

Study	Number of patients	Number of samples used for proteomic analysis	Patient age (mean $\pm$ sem or range)	Patient population	Compared samples (number of samples)	Proteomic approach
3	6	6	?	Hysterectomy specimens	Proliferative vs. mid-secretory (n=3) (n=3)	Isotope-coded affinity tags + Multidimensional liquid chromatography + Nanobore LC-MS/MS
4	20	6	?	Normal fertile women	Mid-proliferative (days 8-10) vs. mid-secretory (days 19-23) (n=3) (n=3)	DIGE + MALDI-TOF/TOF MS
5	11	11	25-35	Healthy women	Late-proliferative vs. mid-secretory (LH+6) (n=5) (n=6)	DIGE + MALDI-TOF-TOF
6	?	12	?	Normal menstrual cycle and free of uterine abnormalities	Mid-proliferative (days 7-10) vs. mid-secretory (days 20-24) (n=6) (n=6)	DIGE + MALDI-MS-MS
7	8	16	23-39	Ovum donors	Early-secretory (LH+2) vs. mid-secretory (LH+7) (n=8) (n=8)	DIGE + MALDI-MS
8,15*	4	8	31.3 $\pm$ 1.5	Fertile women	Early-secretory (LH+2) vs. mid-secretory (LH+7) (n=4) (n=4)	DIGE + MALDI-TOF/MS
Current study	9	18	31.3 $\pm$ 1.8	Patients referred for ICSI for male infertility	Early-secretory (LH+2) vs. mid-secretory (LH+7) (n=9) (n=9)	DIGE + SELDI-TOF/MS-MS
* Article in Chinese						

Table 1 Comparison of the study design of the current and previous mass spectrometry-based proteomic analyses of endometrial samples at different phases of the menstrual cycle.

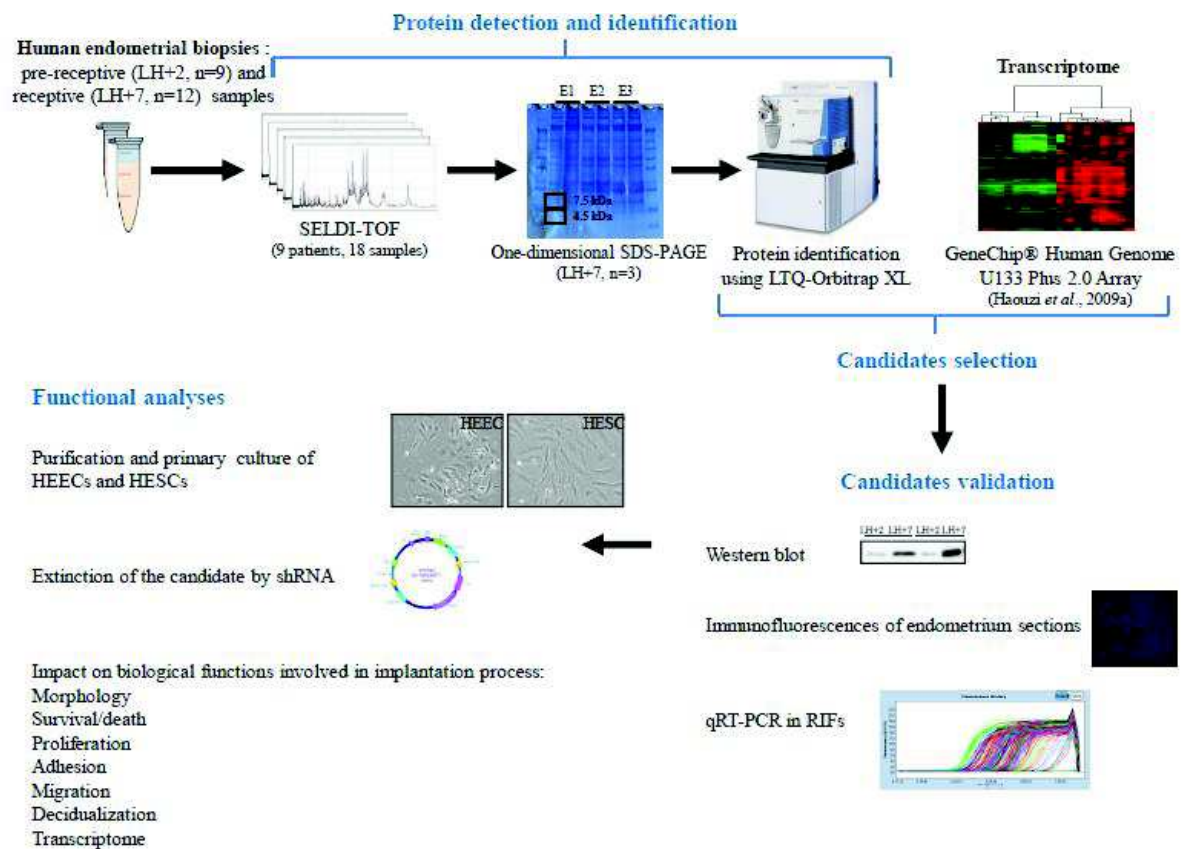


Figure 1 Study workflow: from proteomic pre-screening up to investigation of the function(s) of candidate proteins.

E1-3, endometrial sample 1-3; HEECs, human endometrial epithelial cells; HESCs, human endometrial stromal cells; LH, luteinizing hormone; RIF, repeated implantation failure.

Results

SELDI-TOF profiling of pre-receptive and receptive endometrial samples

To identify proteins that could be involved in the acquisition of the endometrium receptivity phenotype, endometrial biopsies were performed during the pre-receptive [two days after the LH (luteinizing hormone) surge, LH+2; n=9 samples] and receptive phases (seven days after the LH surge, LH+7; n=9 samples) of the same natural cycle in nine patients (mean $\pm$ SEM, age: 31.3 ± 1.8 years) referred for intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) for male infertility. The protein expression profile shift between LH+2 and LH+7 samples was then investigated using the SELDI-TOF technology (Fig. 1 for a summary of the study design). A total of 80 peaks were detected after noise filtering and normalization of SELDI-TOF profiling analyses. Using the Biomarker Wizard Software 3.1 (Mann-Whitney non-parametric statistical test), four peaks with a significant difference ($P < 0.05$) between pre-receptive and receptive endometrial samples were identified [4,470 m/z , $P = 0.047$; 4,553 m/z , $P = 0.019$; 4,634 m/z , $P = 0.047$; 7,465 m/z , $P = 0.038$, respectively]. The results of the statistical analysis were compared using the Wilcoxon signed-rank test (non-parametric statistical test) and three peaks with significant changes were identified [4,470 m/z , $P < 0.0001$; 6,838 m/z , $P < 0.0001$; 7,465 m/z , $P < 0.0001$ respectively]. The two peaks (4,470 m/z and 7,465 m/z) that were found to be significantly differentially expressed by both statistical tests were selected for protein identification. Their peak intensity volume was 7.8 and 2.2 fold higher in LH+7 samples than in LH+2 samples, respectively.

Protein characterization and candidate selection

The proteins included in the 4,470 m/z and 7,465 m/z peaks were then identified using three additional endometrial (LH+7) biopsies from three patients (age: 29 ± 2.7 years) referred for ICSI (Fig. 1). Protein extracts from these biopsies were separated by one-dimensional SDS (sodium dodecyl sulphate)-PAGE electrophoresis (12% polyacrylamide gel) and two gel bands corresponding to 4.5 kDa and 7.5 kDa were excised and analysed by LC-MS/MS after trypsin digestion (Fig. 1). A total of 157 and 95 proteins in the 4,470 m/z and 7,465 m/z peaks, respectively, were detected and 36 proteins were in common between the peaks. In total, 216 proteins were identified (Table S1). To select candidate proteins involved in endometrial receptivity, this list of proteins was compared with our previous transcriptomic data obtained using LH+7 and LH+2 endometrial samples to identify molecules that were over-expressed (both mRNA and protein) during the implantation window (Fig. 1).¹ The identified candidates (n=16) were then compared with previously published transcriptomic and proteomic data on similar

endometrial samples to determine whether they had been previously reported.^{7,10-15} Nine of the 16 identified proteins have been previously described at least once in these studies. As among these candidates there were several members of the S100 family, we decided to focus our investigations on S100A10 and S100A11.

S100A10 and S100A11 are over-expressed during the implantation window in the endometrium of fertile women in natural cycle

The up-regulation of these two candidates in receptive LH+7 endometrium was first validated by western blot analysis of LH+2 and LH+7 endometrium biopsies from two volunteer fertile women (age: 45.5 ± 1.5 years) during the same natural cycle. Densitometric analysis indicated that S100A10 and S100A11 protein levels (relative to GAPDH) were 7.5 and 1.85 times higher during the mid-secretory stage (LH+7) compared to the early-secretory phase (LH+2) (Fig. 2A).

S100A10 and S100A11 are down-regulated in patients with repeated implantation failure and a non-receptive endometrium

S100A10 and S100A11 expression was then evaluated by RT-qPCR in the endometrium (LH+7 samples) of infertile women (n=27; age: 34.6 ± 4.6 years) with repeated implantation failure (RIF) during previous in vitro fertilization (IVF) cycles (≥ 3). Samples were classified as receptive (n=13) or non-receptive (n=14) using the Win-Test (Haouzi *et al.*, 2014). *S100A10* and *S100A11* mRNA expression level were significantly down-regulated (by 2.5- and 2.8-fold, respectively) in non-receptive endometrium samples compared with receptive endometrium samples ($P = 0.0012$ and 0.0001 respectively) (Fig. 2B).

For the functional analysis, we then focused only on S100A10 because of its stronger protein up-regulation in mid-secretory endometrium compared to early-secretory samples.

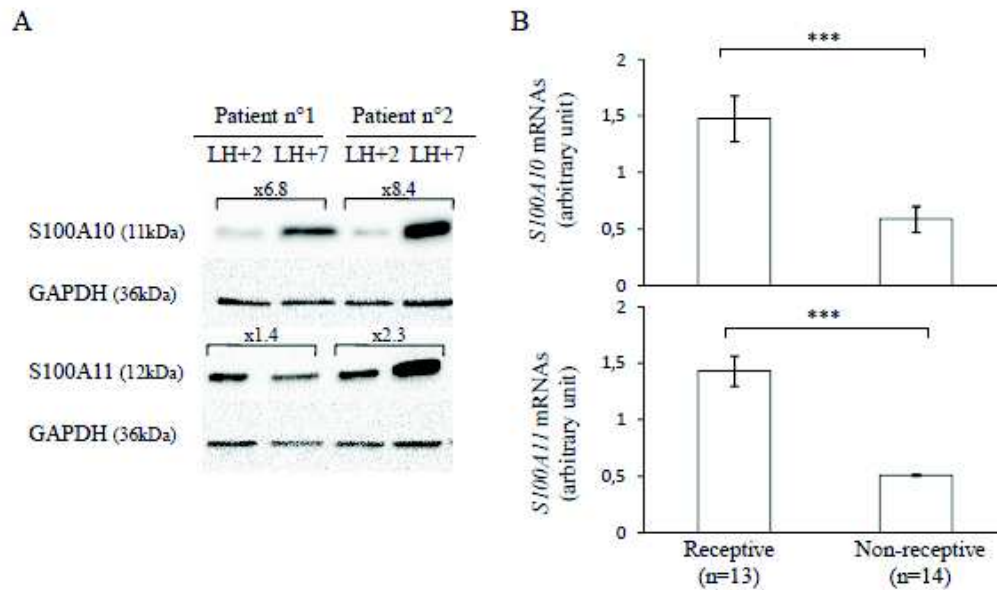


Figure 2 S100A10 and S100A11 expression in endometrium samples from fertile women and patients with RIF.

(A) Western blot analysis of S100A10, S100A11 and GAPDH expression in pre-receptive (LH+2) and receptive (LH+7) endometrium samples obtained from two fertile women during the same menstrual cycle. (B) RT-qPCR analysis of *S100A10* (upper panel) and *S100A11* (lower panel) mRNA expression in LH+7 endometrium samples from patients with RIF classified as receptive or non-receptive using the Win-Test. *S100A10* and *S100A11* mRNA expression were calculated relative to *HPRT1* expression.

The error bars represent the SEM; n, number of samples; *** $P \leq 0.001$.

S100A10 is expressed in both HESCs and HEECs and it is maintained during culture

Immunofluorescence analysis of paraffin-embedded receptive endometrium tissue sections from the two fertile women showed that S100A10 was expressed in both luminal and glandular endometrial epithelial cells and in endometrial stromal cells (Fig. 3A). To investigate the functional roles of S100A10 in endometrium, human endometrial stromal cells (HESCs) and human endometrial epithelial cells (HEECs) were isolated from the endometrial biopsies (LH+7) of the two fertile women. After one passage, the purity of HESC and HEEC cultures was > 95%, based on their morphological features, and reached 98% at passage 5 (Fig. 3B). Primary HESCs and HEECs could be maintained in culture up to passage 10 before the onset of senescence. Analysis of S100A10 protein expression at different passages confirmed that it was expressed in both HESCs and HEECs (Fig. 3C).

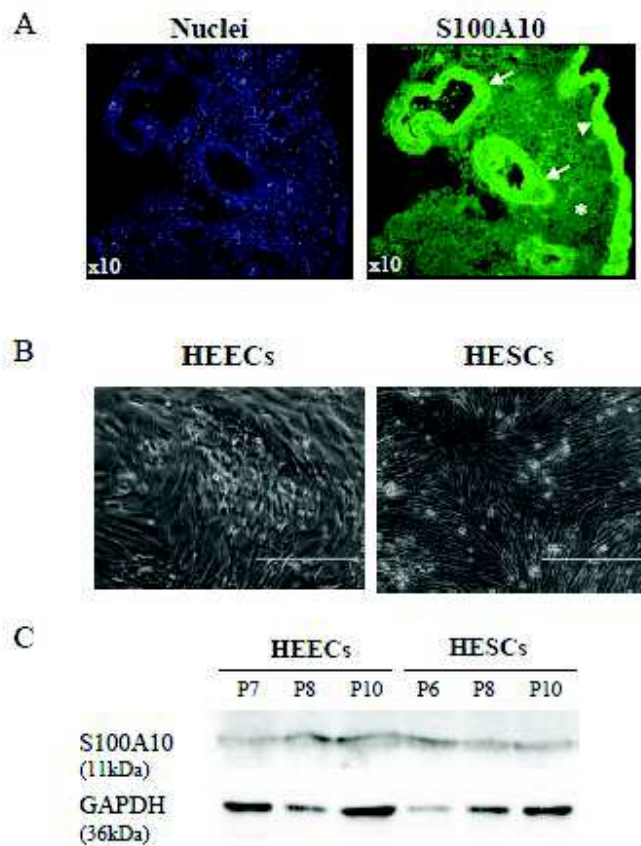


Figure 3 S100A10 protein expression in endometrial samples from fertile women and in primary endometrial cells.

(A) Immunofluorescence analysis of paraffin-embedded endometrium tissue sections using an anti-S100A10 antibody (green) shows S100A10 expression in the endometrial glandular epithelium (arrow), luminal epithelium (arrowhead) and in stromal cells (asterisk). Nuclei (blue) were stained with DAPI. (B) Phase-contrast image of purified primary HEECs and HESCs from endometrium biopsies of two fertile women. Bars, 400 μ m. (C) Western blot analysis of S100A10 and GAPDH protein expression in purified primary HESCs and HEECs at different passages (P).

S100A10 silencing does not affect primary HESC and HEEC morphological features and proliferation

Seventy-two hours after transduction of HESCs and HEECs at passage 6 with the anti-S100A10 or control GFP (green fluorescence protein)-tagged shRNAs, 98% of cells were GFP-positive. Moreover, S100A10 protein levels were significantly reduced in HESCs and HEECs transduced with the specific S100A10 shRNAs compared to control shRNA. S100A10 protein was similarly down-regulated by the different S100A10 shRNAs (1 to 3) with a mean reduction of $86 \pm 7\%$ ($P = 0.0007$) and $63 \pm 9\%$ ($P = 0.045$) in HESCs and HEECs, respectively, compared to control shRNA (Fig. 4A).

Compared to control shRNA, S100A10 silencing did not affect the morphological features of HESCs and HEECs. Similarly, proliferation indexes over 120 hours were not significantly different between S100A10

shRNAs and control shRNA in HESCs (2.89 ± 0.06 vs. 2.99 ± 0.1 , $P = 0.36$) and HEECs (4.05 ± 0.21 vs. 3.48 ± 0.15 , $P = 0.1$).

S100A10 silencing increases apoptosis in serum-starved HEECs

Following culture in medium with 1% foetal bovine serum (FBS) for three days, apoptosis was assessed by calculating the percentage of caspase-3-positive cells. Caspase-3 activation was observed in $35.2 \pm 3.4\%$ of S100A10-silenced HEECs ($n=10,062$ cells) and in $0.8 \pm 0.3\%$ of control shRNA cells ($n=6,357$ cells, $P < 0.0001$) and in $0.03 \pm 0.01\%$ of S100A10-silenced HESCs ($n=8,907$ cells) and in $0.06 \pm 0.04\%$ of control shRNA cells ($n=14,183$ cells, $P = 0.34$). This indicates that upon serum starvation, S100A10 silencing promotes apoptosis in HEECs, but not in HESCs.

S100A10 silencing decreases primary HESC and HEEC migration

Wound healing assay was used to assess whether S100A10 knockdown had any effect on the migration of HESCs and HEECs. After 24 hours, cell migration was significantly reduced in HESCs cells transduced with S100A10 shRNA compared to cell transduced with control shRNA ($26 \pm 2\%$ of colonized surface compared with $57 \pm 5\%$, $P < 0.0001$) (Fig. 4B, left panels). Similar results were obtained in HEECs ($50 \pm 2\%$ of colonized surface in S100A10-silenced cells compared with $85 \pm 2\%$ in control shRNA cells, $P < 0.0001$) (Fig. 4B, right panels).

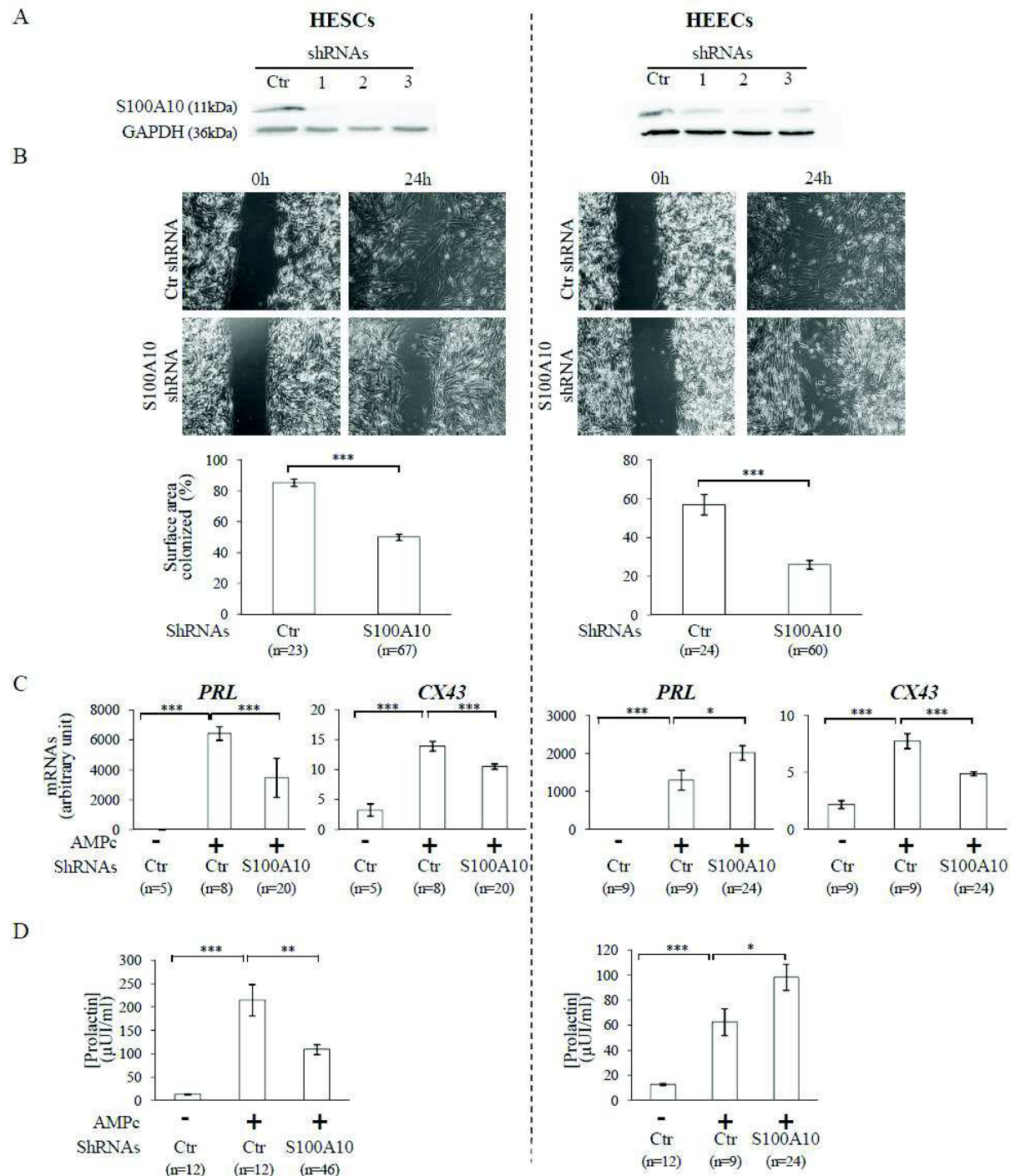


Figure 4: Functional analysis

(A) Western blot analysis of S100A10 and GAPDH protein levels in HESCs and HEECs transduced with control shRNA (Ctrl) and three different shRNAs (1-3) that target specifically S100A10. These results

validate the efficiency of the S100A10 shRNAs. (B) Phase contrast images of wound healing assays to test the effect of S100A10 silencing on cell migration. Images show the surface colonized by HESCs (left panels) and HEECs (right panels) transduced with control shRNA or S100A10 shRNAs at 0 and 24 hours after removal of the inserts. The lower histograms show the quantification of the results (percentage of colonized surface after 24 hours). (C) *PRL* and *CX43* mRNA levels (markers of decidualization) in HESCs and HEECs transduced with control shRNA (Ctr) or S100A10 shRNAs after incubation (+) or not (-) with 8-Br-cAMP (cAMP). (D) Prolactin secretion in culture medium of HESCs and HEECs transduced with control shRNA (Ctr) and S100A10 shRNAs after incubation (+) or not (-) with 8-Br-cAMP (cAMP).

The error bars represent the SEM. n, number of samples. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$ (Student's *t* test).

S100A10 silencing affects decidualization of primary HESCs and HEECs

To determine whether S100A10 had a role in the decidualization of endometrial cells, HESCs and HEECs transduced with S100A10 shRNAs or control shRNA were incubated with 8-bromoadenosine 3':5'-cyclic monophosphate (8-Br-cAMP) for nine days. This treatment induced a decidual phenotype, characterized by a typical epithelial-like morphology, in HESCs and HEECs transduced with control shRNA.

This effect was confirmed by the increased mRNA expression of connexin 43 (*CX43*) and prolactin (*PRL*), two decidualization markers, in 8-Br-cAMP-treated compared with untreated control cells (Fig. 4C; + and – Ctr, respectively). *CX43* mRNA up-regulation was reduced by 45% ($P = 0.0005$) in S100A10-silenced HESCs and by 37% ($P < 0.0001$) in S100A10-silenced HEECs compared with cells transduced with control shRNA (Fig. 4C). *PRL* expression was also significantly reduced by 54% ($P < 0.0001$) in S100A10-silenced HESCs, whereas it was strongly increased by 64% ($P = 0.047$) in S100A10-silenced HEECs compared with cells transduced with control shRNA (Fig. 4C). These findings were validated by quantification of prolactin, which is normally secreted by decidualized endometrium, in the culture medium. Prolactin secretion was increased by 16.3-fold in the culture medium of 8-Br-cAMP-treated HESCs transduced with control shRNA compared with untreated cells (215 ± 33 vs. 13 ± 1 μ UI/ml, $P < 0.0001$) and only by 8.3-fold in S100A10-silenced HESCs (110 ± 10 μ UI/ml, $P = 0.009$, compared to control shRNA), indicating an inhibitory effect of S100A10 silencing on prolactin secretion by HESCs. Conversely, 8-Br-cAMP treatment induced prolactin secretion in both HEECs transduced with control shRNA (62 ± 11 vs. 13 ± 1 μ UI/ml, $P <$

0.0001 compared to untreated cells) and with the S100A10 shRNAs ($98 \pm 10 \mu\text{UI/ml}$, $P = 0.025$, compared to control shRNA), indicating that in HEECs, S100A10 silencing promotes prolactin secretion (Fig. 4D).

S100A10 is not involved in trophoblast cell adhesion

To mimic the trophoblast-decidual interface in early pregnancy, spheroids formed by JAR trophoblast cells were placed on a monolayer of decidualized or undifferentiated HESCs or HEECs transduced with S100A10 shRNAs or control shRNA. After 30 min, the percentage of JAR spheroids attached to undifferentiated HESCs and HEECs transduced with S100A10 shRNAs or control shRNA was not significantly different (40% and 56% vs. 54% and 58%; $P = 0.33$ and 0.78 , respectively). Similar results were obtained when JAR spheroids were placed on decidualized HESCs and HEECs transduced with S100A10 shRNAs or control shRNA (66% and 58% vs. 62% and 63%, $P = 0.57$ and 0.64 , respectively).

Effect of S100A10 knockdown on the transcriptome profiles of primary HEECs and HESCs

Finally, to investigate the effect of S100A10 knockdown on the transcriptome profile of primary endometrial epithelial and stromal cells, cRNA samples from undifferentiated HESCs and HEECs transduced with anti-S100A10 ($n = 6$ and 5 , respectively) or control shRNAs ($n = 5$ and 4 , respectively) were hybridized to HG-U133 plus 2.0 arrays. Concerning the HEEC samples, after the first selection based on the 'present' detection call (in at least four samples), a list delimiting 2,908 genes was submitted to SAM. 37 genes were differentially expressed (34 up-regulated and three down-regulated, including S100A10: $x = 4.4$, $\text{FDR} < 0.0001$) in S100A10-silenced HEECs compared with cells transduced with control shRNA (Fig. 5A and complete list in Table S2). Functional annotation using Ingenuity indicated that the 37 differential expressed genes did not affect any canonical pathway.

For HESCs, SAM analysis performed on the pre-selected list that included 2,061 genes ($\text{CV} \geq 40\%$ and a 'present' detection call in at least five samples) found 256 genes that were differentially expressed in S100A10-silenced HESCs (174 up-regulated and 82 down-regulated genes, including S100A10: $x = 9.1$, $\text{FDR} < 0.0001$) compared with cells transduced with control shRNA (Fig. 5A and complete list in Table S3). Functional annotation of this list of genes identified two canonical pathways, 'the inhibition of angiogenesis by THBS1' [ACVR1C ($x = 2.8$), BMPER ($x = 2.3$), CASP3 ($x = 2.1$), CD36 ($x = 3.9$), DCN ($x = 3.7$), SDC1 ($x = 2.1$) and THBS1 ($x = 3.9$), $P = 1.34\text{E-}03$] and 'the leukocyte extravasation signalling' [CLDN11 ($x = 8.3$), JAM1

(x2.3), *MMP16* (x2.9), *PIK3CD* (x-2.1), *RASGRD1* (x-2.1) and *VAV3* (x2.5), $P = 1.49\text{E-}02$], that were significantly affected by S100A10 silencing in HESCs (Fig. 5B).

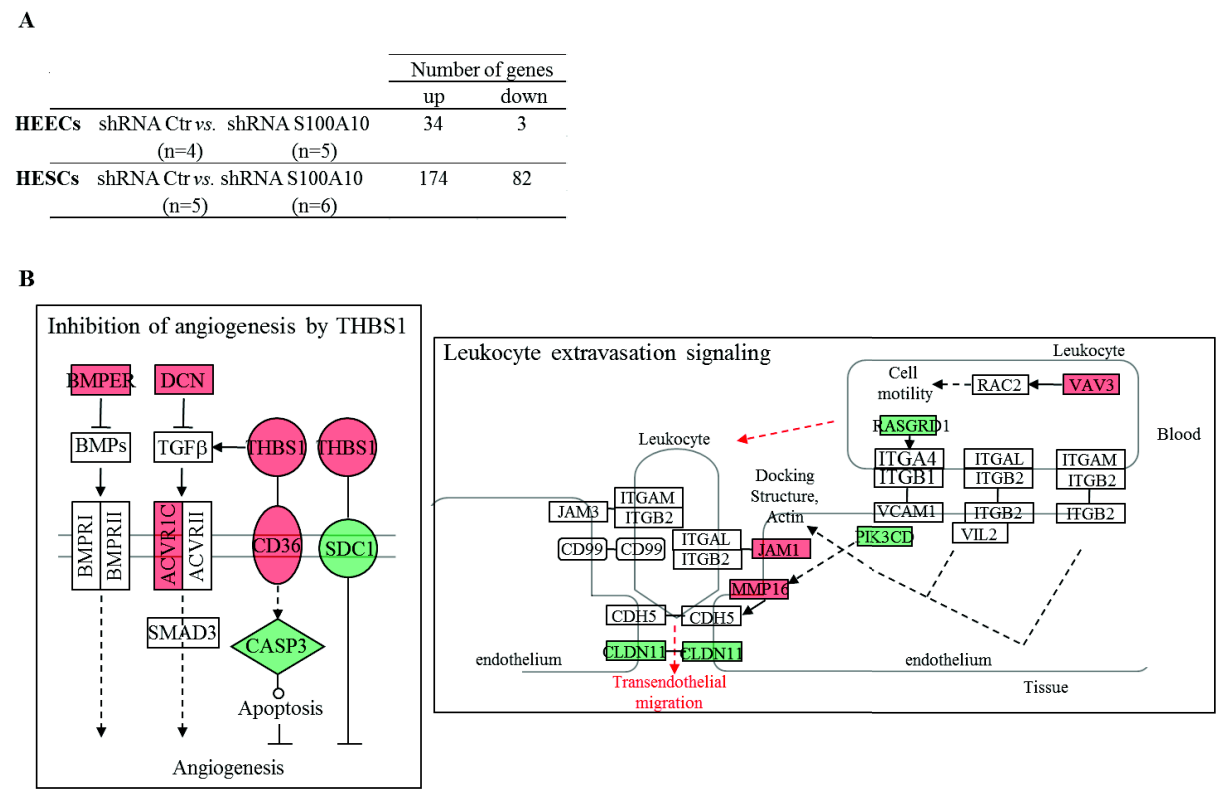


Figure 5 Transcriptome analysis by DNA microarrays of HEECs and HESCs transduced with control shRNA or S100A10 shRNAs. (A) Number of genes that are differentially expressed in S100A10-silenced HEECs and HESCs compared to control cells (control shRNA). (B) Deregulation of genes involved in the angiogenesis inhibition by THBS1 and leucocyte extravasation signalling pathways in S100A10-silenced HESCs compared to control cells.

Green, genes down-regulated by S100A10 knockdown; red, genes up-regulated by S100A10 knockdown. n, number of samples.

Discussion

Improving our knowledge on the factors that regulate the acquisition of the endometrial receptivity phenotype is crucial to better understand the mechanisms that control the embryo-endometrium dialogue during human implantation. Here, we performed a proteomic study to identify proteins that are

differentially expressed in pre-receptive and receptive secretory stages of human endometrium and then assessed the biological functions of one of these molecules (S100A10) in primary HEECs and HESCs. S100A10 silencing affected the migration and decidualization of primary human endometrial epithelial and stromal cells, and promoted apoptosis in serum-starved endometrial epithelial cells. Moreover, transcriptome analysis showed that S100A10 silencing in human endometrial epithelial and stromal cells led to the deregulation of 37 and 256 genes, respectively, related to components of the extracellular matrix and to intercellular connections.

Here, we used the SELDI-TOF technique to determine the proteomic profiles of pre-receptive (LH+2) and receptive (LH+7) endometrial samples. Differently from other mass spectrometry approaches, this technique allows retaining proteins of a sample in a selective way on various chemical surfaces. This selective fixation, combined with the modulation of the stringency of the washes, gives the possibility to detect and analyse minority proteins or proteins with low molecular weight (< 20kDa), such as S100A10, that would otherwise have been masked by the presence of the most abundant proteins in the sample. Due to its high sensibility, the SELDI-TOF technology allows the analysis of proteins for which the classic techniques do not give conclusive results. Indeed, due to its resolution and detection limits, the classical 2D-electrophoresis-based proteomic approach could not identify differentially expressed peaks between pre-receptive and receptive samples. For this reason, we performed proteins identification by LC-MS/MS after excision of the two peaks of interest (4.5 and 7.5kDa). The potential of these two peaks as biomarkers of endometrial receptivity has not been evaluated. We then compared the present proteomic data with our previous transcriptomic data¹ to select candidates the mRNA and protein of which are consistently over-expressed during the implantation window. Using this strategy, we identified 16 potential candidates.

Among the 16 candidate proteins there were several S100 family members (S100A4, S100A6, S100A10 and S100A11). The S100 family includes a group of low molecular weight, acidic proteins that contain two EF-hand calcium-binding motifs. Binding to Ca²⁺ results in a conformational change of S100 proteins that exposes the hydrophobic residues of the C-terminal extension, thus enabling their interaction with various target proteins. The only exception is S100A10 that is permanently locked in an active conformation.¹⁶ They are expressed in many cell types and have a broad range of extracellular and intracellular functions, including cell growth, proliferation, differentiation, apoptosis, inflammation,

motility, migration and invasion.¹⁷ Elevated expression of S100 proteins is associated with several cancers. They are involved in tumour progression because of their roles in cell proliferation, metastasis, angiogenesis and immune evasion.¹⁸ S100A10 and S100A11 also have roles in fertility. Several studies have reported S100A10 up-regulation during the implantation windows in humans⁷ and rhesus monkey¹⁹ and specifically at the implantation site in rhesus monkey. Moreover, down-regulation of S100A11 during the implantation window has been related to pregnancy failure in humans.²⁰ Here, we confirmed the up-regulation of S100A10 and S100A11 mRNA and protein expression during the implantation window in receptive human endometrial samples. In addition, we found that S100A10 and S100A11 mRNA level were significantly reduced in non-receptive endometrium compared to receptive endometrium in patients with RIF. These findings suggest a key role of these two proteins in the acquisition of the endometrial receptivity phenotype.

To investigate S100A10 role in endometrial receptivity, we first assessed its expression. Immunofluorescence analysis of endometrial tissue sections showed that S100A10 was expressed in epithelial luminal and glandular endometrial epithelial cells and in endometrial stromal cells. This is in agreement with a recent study showing S100A10 expression in both epithelial and stromal cells, mainly localized in the cytoplasm and cytomembrane of luminal and glandular epithelia.²¹ Then, S100A10 silencing in primary HESCs and HEECs resulted in migration inhibition. A similar effect was previously reported in human macrophages and S100A10 role in cell migration seems to be plasmin-dependent.^{22,23} Indeed, S100A10 is typically found in a heterotetrameric complex with annexin A2. This complex binds to plasminogen, tissue plasminogen activator or urokinase-type plasminogen activator, leading to the conversion of plasminogen into plasmin.²⁴ Plasmin contribution to cell migration is dependent on its ability to degrade extracellular matrix (ECM) proteins and activate other proteinases with matrix-degrading activity called metalloproteinases.^{23,25} In agreement, here we found that S100A10 silencing in primary endometrial cells induced the transcriptional activation of several ECM components: collagens, proteoglycans and *COL4A6* in both HEECs and HESCs, *COL4A5* and *FN1* in HEECs, *COL11A1*, *LAMA1*, *MMP16*, *SERPINI1*, *VCAN*, *DCN*, *FMOD*, *MCAM* and *NCAM2* in HESCs. Cell polarity remodelling, especially at the apico-basolateral of luminal epithelial cells, is a prerequisite for successful implantation, although we did not find any significant difference in JAR spheroid attachment rate to HESC and HEEC monolayers, and this, independently of the endometrial cell status (decidualized or undifferentiated). Moreover,

functional annotation of S100A10-silenced HESCs revealed deregulation of the angiogenesis and the leukocyte extravasation signalling cascades, two pathways involved in the implantation process.^{26,27}

Serum withdrawal in S100A10-silenced primary HEECs induced apoptosis. As apoptosis plays a crucial role in the endometrium during the implantation window, deregulation of this signalling pathway due to S100A10 down-regulation could explain implantation failures in RIF. Indeed, embryo attachment and invasion through the endometrial epithelial layer and finally implantation in the decidualized stroma are crucial steps for a successful pregnancy. Although disruption of the endometrial epithelial layer was already correlated with apoptosis²⁸, our data provide evidence that S100A10 plays a crucial role in apoptosis of endometrial epithelial cells. S100A10 role in apoptotic signalling could also be associated with the formation of the heterotetrameric complex with annexin A2 because this complex has been implicated also in apoptosis and tissue integrity.²⁹ The mechanism whereby S100A10 down-regulation affects apoptosis, and consequently implantation, needs to be precisely investigated.

S100A10 silencing affected differentially the decidualization of primary HESCs and HEECs. Decidualization is a complex maturation process that involves morphological and functional changes in the endometrial cell structure and physiology. It could be considered as the postovulatory endometrial remodelling in preparation for pregnancy and includes the secretory transformation of the uterine glands, influx of specialized uterine natural killer cells and vascular remodelling.³⁰ Decidualization has been widely investigated using *in vitro* culture models, mainly stromal endometrial cells.³¹ In contrast, the behaviour of epithelial endometrial cells during the decidualization process has rarely been studied.³² Yet, there are many evidences that both luminal and glandular uterine epithelial cells play a key role in the regulation of stromal cell decidualization.^{33,34} Our data indicate that following incubation with 8-Br-cAMP to induce decidualization, HESCs and also HEECs could secrete prolactin, a hormone playing a key role in the establishment and maintenance of pregnancy. S100A10 silencing inhibited prolactin secretion in HESCs, but significantly enhanced it in HEECs. The molecular mechanisms by which S100A10 deficiency affects differently the prolactin secretion must be investigated. Nevertheless, as decidualization is essential for the acquisition of the endometrial receptivity phenotype, both up- or down-regulation of molecules involved in this process, such as S100A10, could contribute to embryo implantation failure.

Embryo implantation is a tremendously complicated process that involves the specific remodelling of the endometrium to become receptive, a competent embryo and the synchronization between endometrium and embryo age. Therefore, by affecting migration, decidualization and apoptosis, some major biological functions involved in the implantation process, S100A10 might play a key role during implantation. These findings suggest that S100A10 is a relevant candidate biomarker for predicting implantation failure, particularly due to inadequate endometrial receptivity.

Material and Methods

Endometrial samples

Endometrial samples were from women recruited after written informed consent. For protein profiling using the SELDI-TOF technology, human endometrial biopsies were performed during the pre-receptive (LH+2) and receptive (LH+7) phases of the same natural cycle in nine patients (mean $\pm$ SEM, age: 31.3 ± 1.8 years) referred for ICSI due to male infertility. For protein identification by the LC/MS/MS, three additional endometrial biopsies performed during the mid-secretory phase (LH+7) from three patients (age: 29 ± 2.7 years) referred for ICSI were included (Fig. 1). To validate the selected protein candidates by western blotting, immunofluorescence staining of paraffin-embedded endometrium tissue sections and quantitative RT-PCR (Fig. 1), paired endometrial biopsies (LH+2 and LH+7 during the same natural cycle) from two volunteer fertile women (age: 45.5 ± 1.5 years) were used. The LH surge was estimated with LH urinary kits. These women had natural pregnancies, had not taken any treatment in the previous three months and had no uterine pathologies. In addition, single endometrial biopsy during the implantation window (at LH+7-8, or progesterone +6-8 for patients under natural and hormonal replacement therapy, respectively) were obtained from 27 patients (age: 34.6 ± 4.6 years) with RIFs during previous IVF cycles (≥ 3).

Preparation of endometrial samples for SELDI-TOF MS/MS analysis

Total proteins were concurrently extracted from endometrial biopsies with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Pellets were resuspended in 50 μ l of 50mM Tris pH 7.5 with 0.5% Triton X-100. 5 μ l of each sample were used to determine the protein concentration with the bicinchoninic acid (BCA) assay (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Protein samples were stored at -80°C until analysis.

Profiling of endometrium proteins using SELDI-TOF MS

For SELDI-TOF analysis, 40µg of each protein sample was diluted 10 times with binding buffer (100 mM Tris pH 9 + 0.1% Triton X-100) for application on Q10 (anion exchange) ProteinChip arrays (BioRad, Hercules, CA, USA). Q10 ProteinChip arrays were pre-equilibrated with 150µL of binding buffer in a 96-well bioprocessor and incubated with gentle agitation for 5min. After removing the binding buffer from the wells, samples were added and incubated on a plate shaker at room temperature (RT) for 1 hour. Wells were washed twice with binding buffer and once with 100 mM Tris pH 9 for 5 min, followed by a final brief rinse with water. Q10 ProteinChip arrays were removed from the bioprocessor and air-dried. Finally, 0.8 µL of saturated sinapinic acid solution was applied twice to each spot and chips were allowed to air-dry. Mass spectrometric analysis was performed using SELDI-TOF in a PCS4000 ProteinChip reader (BioRad) and the same settings for all samples and for data collection (calibration, focusing mass, laser intensity and detector sensitivity). Each spectrum was an average of 530 laser shots. External calibration was done with the All-in-1 Protein Standard II (BioRad). Spectra analysis was carried out using the ProteinChip Data Manager 3.5 (BioRad). The background was subtracted using the default software settings. Peaks with a ratio signal/noise above 3 were identified by the ProteinChip software. Differentially expressed mass peaks ($P < 0.05$) were selected for protein identification using the Biomarker wizard software 3.1 (CIPHERgen Biosystems, Fremont, CA, USA).

One-dimensional SDS-PAGE

Proteins from three additional endometrial biopsies (LH+7) were extracted with the RNeasy Mini Kit, as described above. The NuPAGE Electrophoresis system (Invitrogen, Saint Aubin, France) was used for protein separation. Briefly, following the manufacturer's protocol, 40 µg of each sample in 30 µL of 4X LDS (lithium dodecyl sulfate) buffer were loaded on 12% Bis-Tris gels. Protein separation was performed in MOPS running buffer at 100 V for 1 hour. Gels were stained with colloidal Coomassie following the manufacturer's protocol (GelCode, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) and then scanned using an Epson 1680 scanner. Two gel bands were manually excised at around 4.5 and 7.5 kDa and stored in PCR tubes (Eppendorf, Montesson, France).

Protein identification using High Resolution Mass Spectrometry

The excised gel bands were spun to remove the excess water. 150 µL of 50% ethanol and 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8.4) were then added at RT for 20 min. The gel bands were dried on a

vacuum concentrator (Labconco, Kansas City, MO, USA) and processed using a Bravo AssayMAP platform (Agilent, Les Ulis, France). Briefly, 30 µL of denaturing solution (20 mM DTT, 100 mM Tris pH 8.5) was added at 37°C under agitation for 1 hour. Alkylation was then performed by adding 6 µL of alkylation solution (400 mM iodoacetamide, 1M Tris pH 11) at 37°C for 30 min. Before the digestion step, samples were diluted with 210 µL of 20 mM Tris pH 8.5/2 mM DTT. Protein digestion with 0.5 µg trypsin was carried out at 37°C overnight and then stopped by adding 15 µL formic acid (pH < 4). The obtained peptides were desalted using C18 AssayMAP tips according to the manufacturer's instructions. Samples were then transferred to LoBind tubes (Eppendorf), dried in a vacuum concentrator (Labconco) and resuspended in 20 µL of 2% acetonitrile/0.1% formic acid/97.9% water for 10 min under agitation.

Peptides were concentrated on a pre-column (Dionex, C18 PepMap100, 300 µm × 5 mm, 5 µm, 100 Å) and separated through a reversed-phase capillary column (Dionex, C18 PepMap100, 75 µm × 150 mm, 2 µm, 100 Å) over 45 min. Peptide fragmentation was carried out with an LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with a nano-ESI source and performed in the positive ion mode. Xcalibur 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific) was used for data processing and result delivery.

Mass spectrometry (MS) data were interrogated with Mascot v2.3 against CPS_human (CPS_human_20120125). The selected enzyme was trypsin. The interrogation parameters accepted one putative missed cleavage, a 15 ppm and 0.05 Da mass range for the parent peptide and for the MS/MS fragment, respectively. As proteins were reduced and alkylated, carbamidomethylation was selected as fixed modification and methionine oxidation as variable modification. Management and validation of MS data were performed using the Proteome Discoverer software (Thermo Fisher Scientific) and Mascot V2.3 (Matrix Sciences, London, UK) with significance threshold $P < 0.01$, with a minimum of one peptide per protein (Table S1).

Isolation and culture of primary human endometrial cells

A portion of the endometrial biopsies (LH+7) from the two fertile patients was rinsed with phosphate buffered saline (PBS), minced into small fragments (0.5 - 1 mm) and digested by incubation with 300 µg/ml collagenase Type III (Sigma-Aldrich) and 40 µg/ml deoxyribonuclease I (Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Canada) in PBS at 37 °C for 30 min. For HEEC isolation, Dynabeads Epithelial Enrich beads coated with the monoclonal antibody BerEP4 against the human epithelial antigen EpCAM (Invitrogen) were used. Then, the supernatant was incubated with Dynabeads bound to the antibody against CD45 (Invitrogen) that targets leukocytes, thus leaving purified HESCs. Primary endometrial cells

were culture in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/F12 supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin solution (Invitrogen). HEEC cultures were enriched with 10ng/ml of recombinant human long epidermal growth factor (GroPep Bioreagents, Thebarton, Australia). HESCs and HEECs were grown in 5% CO₂ at 37°C. Culture medium was routinely changed and sub-confluent monolayers were passaged with 0.25% trypsin-EDTA (Invitrogen). The purity of HESC and HEEC cultures was evaluated based on their morphological features.

Western blotting

Total proteins from endometrial biopsies (n=2 LH+2 and n=2 LH+7 samples) from the two fertile women and from primary endometrial cells were directly extracted in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 supplemented with 1X protease inhibitors cocktail (Roche, Mannheim, Germany)). After tissue or cell dissociation by pipetting, suspensions were incubated at 4°C for 30 min and centrifuged at 16100g for 10 min. Supernatants were recovered for protein quantification using the BCA assay kit. Proteins from endometrial biopsies (20 µg) or primary endometrial cells (15 µg) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (12% polyacrylamide), transferred to nitrocellulose membranes and incubated with 2 µg/ml mouse anti-human S100A11 monoclonal antibody (R&D systems, Lille, France) or 0.4 µg/ml rabbit anti-human S100A10 polyclonal antibody (Sigma-Aldrich), and 0.05 µg/ml mouse anti-human GAPDH monoclonal antibody (R&D systems). Blots were then incubated with the relevant peroxidase-conjugated anti-immunoglobulin and revealed using an ECL detection system (SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate, Thermo Fisher Scientific). Bands were visualized using the molecular imager ChemiDoc XRS System (BioRad). For quantification, the expression of the target protein was normalized to GAPDH and expressed as arbitrary unit.

Immunofluorescence staining

Endometrial biopsies from the two fertile women were fixed in 4 % neutrally buffered formaldehyde (DiaPath S.p.A, Italy) and paraffin-embedded. Tissue sections (5µm thickness) were deparaffinized and rehydrated and rinsed three times with PBS for 10 min. Then, they were permeabilized in 0.1% Triton X-100 for 10 min, rinsed in PBS and blocked with 1% bovine serum albumin (BSA). Sections were incubated with 1 µg/ml rabbit polyclonal anti-S100A10 antibody (Sigma-Aldrich) at 4°C overnight, followed by the appropriate fluorochrome-labelled secondary antibody for 1 hour at room temperature. Control sections were stained with the secondary antibody only. Nuclei were counterstained with 10 µg/ml DAPI. DAKO

fluorescent mounting medium was used (DAKO, Les Ulis, France). Images were acquired with an Axiovert 200 inverted fluorescence microscope (Carl Zeiss, France).

ShRNA-mediated silencing

S100A10 MISSION Lentiviral transduction particles (S100A10 shRNA) and non-target scrambled DNA (control shRNA) were from Sigma-Aldrich. The shRNA vector was pLKO.1-puro-CMV-TurboGFP and the DNA sequences are reported in Table S4. Primary endometrial cells were seeded in T-175 flasks to reach 50-80% confluence in 24 hours. Cells were transduced with 8 µg/ml hexadimethrine bromide (Sigma-Aldrich) and the lentiviral particles at a multiplicity of infection of 20. After 24 hours, the medium containing the viral particles was replaced with fresh medium. The day after, infected cells were selected with 1µg/ml puromycin dihydrochloride (Sigma-Aldrich) for 48 hours and then selection was maintained by adding 0.1µg/ml puromycin dihydrochloride to the medium that was changed every three days. GFP expression in the infected cells was observed using an EVOS digital inverted microscope (Advanced Microscopy Group, Thermo Fisher Scientific). Gene silencing was validated by western blotting.

Migration assay and time-lapse video microscopy

For the wound healing experiments, 25,000 cells in 70 µl of culture medium were plated in each IBIDI culture insert in a 12-well plate to reach sub-confluence in 24 hours (Biovalley, Marne la Vallée, France). Then, the inserts were removed to form a 500 µm cell-free gap. Cells were rinsed carefully with PBS and fresh medium was added. Cell migration was monitored by time-lapse video-microscopy using an Axiovert 200 motorized inverted microscope at 37°C in 5% CO₂ (5x magnification). Images were acquired at 5 min intervals for 24 hours. Three independent experiments were performed corresponding to 90 IBIDI culture inserts for HESCs (23 for cells transduced with control shRNA and 67 for S100A10 shRNAs) and 84 inserts HEECs, (24 for cells transduced with control shRNA and 60 for S100A10 shRNAs). Images were analysed with the ImageJ macro MRI Wound healing tool (Montpellier RIO Imaging, Montpellier, France). The percentage of colonized surface was measured 24 hours after insert removal.

Decidualization assay

Cells were seeded in 12-well plates at a density of 120,000 cells/well (HESCs) and 135,000 cells/well (HEECs) to reach 80% confluence after 24 hours. Cells were then incubated with 0.5 8-Br-cAMP (Sigma-Aldrich) to induce decidualization. Cells were photographed with an EVOS digital inverted microscope

(AMG). After nine days of treatment (medium with 8-Br-cAMP was changed every three days), cells were harvested in RLT buffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) to prepare RNA for RT-qPCR analysis of biomarkers of cells decidualization (*CX43*, and *PRL*). Spent culture medium was also collected and stored at -80° for prolactin quantification.

Prolactin quantification

Prolactin secretion in the spent medium of primary endometrial cell cultures incubated or not with 8-Br-cAMP was measured with the automated immunoassay system BRAHMS KRYPTOR (BRAHMS, Clichy, France). The inter-assay and intra-assay coefficients of variation were 3.7% and 3.5%, respectively, and the limit of sensitivity was 5 µUI/ml.

JAR spheroid attachment assay

To study the interactions of human trophoblast cells with endometrium we employed an *in vitro* model where spheroids made using the human choriocarcinoma cell line JAR (ATCC, Molsheim, France) were co-cultured on a monolayer of primary endometrial cells. Multicellular JAR spheroids were prepared by culturing a cell suspension of 850,000 JAR cells per ml in RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine (Thermo Fisher scientific), 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin solution with shaking at 40 rpm at 37°C for 24 hours. Control and S100A10 shRNA-expressing HEECs and HESCs were cultured to reach confluence in Lab-Tek Chamber Slide System wells (8 wells, Dominique Dutscher, Brumath, France). Medium was removed from confluent monolayers of HEECs and HESCs and replaced by fresh RPMI medium supplemented, as described above. JAR spheroids (100-150 µm) were deposited on confluent HEEC and HESC monolayers (5-10 spheroids per well). After 30 min, non-adherent spheroids were removed by gentle pipetting. The number of attached JAR spheroids was counted under a binocular microscope. Spheroid attachment to endometrial cell monolayers was expressed as the percentage of adherent spheroids divided by the total number of deposited spheroids. The same experiment was performed also with control and S100A10 shRNA-expressing HEECs and HESCs after induction of decidualization by incubation with 8-Br-cAMP for nine days.

Apoptosis quantification

Control and S100A10 shRNA-expressing cells were plated on coverslips in 24-well plates at a density of 65,000 (HESCs) and 80,000 (HEECs) cells/well and cultured in complete DMEM/F12 medium with 1%

heat-inactivated FBS. After three days, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min, rinsed in PBS and blocked with 1% BSA. Cells were incubated with the polyclonal anti-caspase-3 antibody (Cell Signaling) followed by the appropriate fluorochrome-labelled secondary antibody (both at RT for 1 hour). Nuclei were counterstained with 10 µg/ml DAPI and cells mounted with DAKO fluorescent mounting medium. Images were acquired with an Axiovert 200 inverted fluorescence microscope. The apoptosis rate was calculated as the percentage of caspase-3-positive cells relative to the total number of cells visualized by DAPI.

Quantitative RT-PCR analyses

500 µg of RNA from endometrial biopsies and 200 µg of RNA from primary endometrial cells were used for reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). Endometrium samples were obtained from patients with RIF diagnosed as receptive (n=13) and non-receptive (n=14) using the Win-Test (Window Implantation Test).³⁵ For qPCR, 2 µl (of a 1:5 dilution) first strand DNA were added to a 10 µl reaction mixture containing 0.25 µM of each primer and 5 µl of 2X LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche). DNA was amplified for 45 cycles with annealing temperature at 63°C using the Light Cycler 480 detection system (Roche). Gene expression was normalized to *HPRT1* expression using the following formula: $E_{\text{tested gene}}^{\Delta Ct} / E_{\text{HPRT1}}^{\Delta Ct}$ ($E = 10^{-1/\text{slope}}$), $\Delta Ct = Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{unknown}}$, where E corresponds to the efficiency of the PCR reaction. The E value was obtained by a standard curve that varies in function of the used primers. A receptive endometrium sample was used as control. Each sample was analysed in duplicate and multiple water blanks were included. The primer sequences are in Table S5.

Microarray hybridization and data analysis

Affymetrix microarrays were processed at the Microarray Core Facility of the Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy, CHRU-INSERM-UM Montpellier (<http://irmb.chu-montpellier.fr>). Total RNA (100 ng) was used to prepare twice-amplified and labelled cRNA samples for hybridization with HG-U133 plus 2.0 arrays (AffymetrixTM, United Kingdom, UK), as described in Haouzi.³⁵ Each endometrial sample was processed individually on a separate DNA microarray chip. Scanned GeneChip images were processed using the Affymetrix GCOS 1.4 software to obtain the intensity value signal and the

absent/present detection call for each probe set using the default analysis settings and global scaling as first normalization method. Probe intensities were derived using the MAS5.0 algorithm.

To determine the impact of shRNA-mediated silencing of S100A10 in HEECs and HESCs, we compared gene expression profiles between cells transduced with control shRNA (n=4 for HEECs and n=5 for HESCs) and with S100A10 shRNAs (n=5 for HEECs and n=6 for HESCs). A first selection was carried out using the detection call (present in at least 4 HEEC samples and 5 HESC samples) and a coefficient of variation (CV) $\geq 40\%$ between HEECs and HESCs. Then, the significant analysis of microarrays³⁶ (SAM, Stanford University, USA) was used to identify genes that were significantly differentially expressed in S100A10 shRNA-expressing HEECs or HESCs compared with control shRNA-expressing HEECs or HESCs. The list of differentially expressed genes (Fold change, FC >2; False discovery rate, FDR < 5%) was submitted to Ingenuity (<http://www.ingenuity.com>) to identify the signalling pathways altered in S100A10-silenced endometrial cells.

Statistical analyses

Excepted for proteomics and transcriptomic data, statistical analyses were performed with the GraphPad InStat 3 software. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM and differences between groups were considered significant when the Student's *t*-test gave a $P < 0.05$.

Authors' roles

LB: performed most of the experiments and analyses and participated in the paper redaction; LD: performed the apoptosis experiments and their quantification; Y.A: performed RT-qPCR in RIF patients; LT, CH, SL: performed proteomic experiments and analyses, contributed to proteomic data interpretation and participated in the paper redaction; IJK, FB: participated to the patients' recruitment; HP: performed endometrial tissue sections; DH, SH: participated in the study conception/design, data interpretation, paper redaction and final approval.

Acknowledgements

We thank the ART teams from Montpellier Hospital for their assistance during this study. We thank Dr. Paris F. for her help and implication in prolactin quantification in culture medium, as well as Dr Jacques Faidherbe for his help in patients' recruitment.

Funding

This work was partially supported by a grant from the Ferring Pharmaceutical Company.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

The authors of the study have no competing interests to report.

References

1. Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, Rème T, Dewailly D, Hamamah S. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod* 2009; 24:198-205; PMID:18835874; <http://dx.doi.org/doi/10.1093/humrep/den360>.
2. Haouzi D, Dechaud H, Assou S, De Vos J, Hamamah S. Insights into human endometrial receptivity from transcriptomic and proteomic data. *Reprod Biomed Online* 2012; 24:23-34; PMID:22119322; <http://dx.doi.org/doi/10.1016/j.rbmo.2011.09.009>.
3. DeSouza L, Diehl G, Yang EC, Guo J, Rodrigues MJ, Romaschin AD, Colgan TJ, Siu KW. Proteomic analysis of the proliferative and secretory phases of the human endometrium: protein identification and differential protein expression. *Proteomics* 2005; 5:270-81; PMID:15602768.
4. Chen JI, Hannan NJ, Mak Y, Nicholls PK, Zhang J, Rainczuk A, Stanton PG, Robertson DM, Salamonsen LA, Stephens AN. Proteomic characterization of midproliferative and midsecretory human endometrium. *J Proteome Res* 2009; 8:2032-44; PMID:19714818.
5. Parmar T, Gadkar-Sable S, Savardekar L, Katkam R, Dharma S, Meherji P, Puri CP, Sachdeva G. Protein profiling of human endometrial tissues in the midsecretory and proliferative phases of the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2009; 92:1091-03; PMID:18793766; <http://dx.doi.org/doi/10.1016/j.fertnstert.2008.07.1734>.
6. Rai P, Kota V, Sundaram CS, Deendayal M, Shivaji S. Proteome of human endometrium: identification of differentially expressed proteins in proliferative and secretory phase endometrium. *Proteomics Clin Appl* 2010; 4:48-59; PMID:21137015; <http://dx.doi.org/doi/10.1002/prca.200900094>.
7. Domínguez F, Garrido-Gómez T, López JA, Camafeita E, Quiñonero A, Pellicer A, Simón C. Proteomic analysis of the human receptive versus non-receptive endometrium using differential in-gel electrophoresis and MALDI-MS unveils stathmin 1 and annexin A2 as differentially regulated. *Hum Reprod* 2009; 24:2607-17; PMID:19556289; <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dep230>.

8. Li J, Tan Z, Li M, Xia T, Liu P, Yu W. Proteomic analysis of endometrium in fertile women during the prereceptive and receptive phases after luteinizing hormone surge. *Fertil Steril* 2011; 95:1161-63; PMID:20979995; <http://dx.doi.org/doi/10.1016/j.fertnstert.2010.09.033>.
9. Altmäe S, Esteban FJ, Stavreus-Evers A, Simón C, Giudice L, Lessey BA, Horcajadas JA, Macklon NS, D'Hooghe T, Campoy C, et al. Guidelines for the design, analysis and interpretation of 'omics' data: focus on human endometrium. *Hum Reprod Update* 2014; 20:12-28; PMID:24082038; <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmt048>.
10. Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, Yuan L, Fritz MA, Lessey B. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 871-79; PMID:12200466.
11. Riesewijk A, Martín J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, Mosselman S, Simón C. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003; 9:253-64; PMID:12728018.
12. Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, Bocca S, Oehninger S. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* 2005; 20:2104-17; PMID:15878921.
13. Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, et al. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006; 147:1097-1121; PMID:16306079.
14. Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alamá P, Pellicer A, Simón C. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril* 2011; 95:50-60, 60.e1-15. PMID:20619403; <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.04.063>.
15. Li J, Tan Z, Li MT, Liu YL, Liu Q, Gu XF, Zhou JZ, Zhuang GL. [Study of altered expression of annexin IV and human endometrial receptivity]. *Zhonghua Fu Chan KeZaZhi* 2006; 41:803-5; PMID:17327107.
16. Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J* 2006; 396:201-214; PMID:16683912.
17. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med* 2013; 13:24-57; PMID:22834835.

18. Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15:96-109; PMID:25614008; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3893>.
19. Sun XY, Li FX, Li J, Tan YF, Piao YS, Tang S, Wang YL. Determination of genes involved in the early process of embryonic implantation in rhesus monkey (*Macaca mulatta*) by suppression subtractive hybridization. *Biol Reprod* 2004; 70:1365-73; PMID:14724130.
20. Liu XM, Ding GL, Jiang Y, Pan HJ, Zhang D, Wang TT, Zhang RJ, Shu J, Sheng JZ, Huang HF. Down-regulation of S100A11, a calcium-binding protein, in human endometrium may cause reproductive failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:3672-83; PMID:22869607; <http://dx.doi.org/doi/10.1210/jc.2012-2075>.
21. Wei X, Tong S, Yan Q. Cyclic changes of S100A10 expression in human endometrium [in Chinese]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2014; 94:2152-2155; PMID:25327866.
22. O'Connell PA, Surette AP, Liwski RS, Svenningsson P, Waisman DM. S100A10 regulates plasminogen-dependent macrophage invasion. *Blood* 2010; 116:1136-46; PMID:20424186; <http://dx.doi.org/doi/10.1182/blood-2010-01-264754>.
23. Phipps KD, Surette AP, O'Connell PA, Waisman DM. Plasminogen receptor S100A10 is essential for the migration of tumor-promoting macrophages into tumor sites. *Cancer Res.* 2011; 71:6676-83; PMID:22042827; <http://dx.doi.org/doi/10.1158/0008-5472>.
24. Kwon M, MacLeod TJ, Zhang Y, Waisman DM. S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors. *Front Biosci.* 2005; 10:300-25; PMID:15574370.
25. Gross SR, Sin CG, Barraclough R, Rudland PS. Joining S100 proteins and migration: for better or for worse, in sickness and in health. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71:1551-79; PMID:23811936; <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-013-1400-7>.
26. Dominguez F, Yáñez-Mó M, Sanchez-Madrid F, Simón C. Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? *FASEB J* 2005; 19:1056-60; PMID:15985528.
27. Haouzi D, Assou S, Mahmoud K, Tondeur S, Rème T, Hedon B, De Vos J, Hamamah S. Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Hum Reprod* 2009; 24:1436-45; PMID:19246470; <http://dx.doi.org/doi/10.1093/humrep/dep039>.
28. Boeddeker SJ, Hess AP. The role of apoptosis in human embryo implantation. *J Reprod Immunol* 2015; 108:114-22. PMID:25779030; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2015.02.002>.

29. Hitchcock JK, Katz AA, Schäfer G. Dynamic reciprocity: the role of annexin A2 in tissue integrity. *J Cell Commun Signal* 2014; 8:125-33; PMID:24838661; <http://dx.doi.org/doi/10.1007/s12079-014-0231-0>.
30. Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med* 2007; 25:445-53; PMID:17960529.
31. Blois SM, Klapp BF, Barrientos G. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells. *J Reprod Immunol* 2011; 88:86-92; PMID:21227511; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2010.11.002>.
32. Wang H, Pilla F, Anderson S, Martínez-Escribano S, Herrer I, Moreno-Moya JM, Musti S, Bocca S, Oehninger S, Horcajadas JA. A novel model of human implantation: 3D endometrium-like culture system to study attachment of human trophoblast (Jar) cell spheroids. *Mol Hum Reprod* 2012; 18:33-43; PMID:21989169; <http://dx.doi.org/doi/10.1093/molehr/gar064>.
33. Pawar S, Starosvetsky E, Orvis GD, Behringer RR, Bagchi IC, Bagchi MK. STAT3 regulates uterine epithelial remodeling and epithelial-stromal crosstalk during implantation. *Mol Endocrinol* 2013; 27:1996-2012; PMID:24100212; <http://dx.doi.org/doi/10.1210/me.2013-1206>.
34. Pawar S, Laws MJ, Bagchi IC, Bagchi MK. Uterine epithelial estrogen receptor alpha controls decidualization via a paracrine mechanism. *Mol Endocrinol* 2015; 29:1362-74; PMID:26241389; <http://dx.doi.org/doi/10.1210/me.2015-1142>.
35. Haouzi D, Bissonnette L, Gala A, Assou S, Entezami F, Perrochia H, Dechaud H, Hugues JN, Hamamah S. Endometrial receptivity profile in patients with premature progesterone elevation on the day of HCG administration. *Biomed Res Int* 2014; 2014:951937; PMID:24877150; <http://dx.doi.org/doi/10.1155/2014/951937>.
36. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:5116-21; PMID:11309499.

Swiss-Prot number	Number of peptide spectrum match	Number of peptidic fragments	MW (kDa)	Description
A0M8Q6	1	1	11,3	Ig lambda-7 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGLC7 PE=1 SV=2 - [LAC7_HUMAN]
A2A2D0	2	2	9,9	Stathmin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=STMN1 PE=3 SV=1 - [A2A2D0_HUMAN]
A4D286	3	3	20,7	Similar to Nuclear protein Hcc-1 (HSPC316) (Proliferation associated cytokine-inducible protein CIP29) OS=Homo sapiens GN=LOC402290 PE=4 SV=1 - [A4D286_HUMAN]
A6NGP5	1	1	18,9	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=HN1L PE=2 SV=2 - [A6NGP5_HUMAN]
A8MZ71	3	2	9,4	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=COX7A2 PE=4 SV=1 - [A8MZ71_HUMAN]
B3KRY5	1	1	39,0	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=PTRF PE=2 SV=1 - [B3KRY5_HUMAN]
B3KXC6	4	2	22,8	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=TOLLIP PE=2 SV=1 - [B3KXC6_HUMAN]
B4DKM5	1	1	27,5	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=VDAC2 PE=2 SV=1 - [B4DKM5_HUMAN]
B4DN37	2	2	38,7	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=DEK PE=2 SV=1 - [B4DN37_HUMAN]
B4DPJ6	2	2	17,5	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=TPD52L2 PE=2 SV=1 - [B4DPJ6_HUMAN]
B4DR70	4	1	44,8	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=FUS PE=2 SV=1 - [B4DR70_HUMAN]
B4DRD7	1	1	29,7	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=PCBP2 PE=2 SV=1 - [B4DRD7_HUMAN]
B4DX66	1	1	62,8	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=EPS8 PE=2 SV=1 - [B4DX66_HUMAN]
B4DZP4	2	1	45,0	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=DYNC1L12 PE=2 SV=1 - [B4DZP4_HUMAN]
B4E1D3	2	1	54,2	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=FGB PE=2 SV=1 - [B4E1D3_HUMAN]
B4E241	3	3	14,2	Splicing factor, arginine/serine-rich 3, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=SFRS3 PE=2 SV=1 - [B4E241_HUMAN]
B7Z4K6	3	2	33,6	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=DNASE2 PE=2 SV=1 - [B7Z4K6_HUMAN]

B8ZZ51	2	2	18,7	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=MDH1 PE=4 SV=1 - [B8ZZ51_HUMAN]
B9ZVR1	2	2	85,3	Microtubule-associated protein OS=Homo sapiens GN=MAP4 PE=4 SV=3 - [B9ZVR1_HUMAN]
C0H5W9	1	1	33,5	SNX6 protein OS=Homo sapiens GN=SNX6 PE=2 SV=1 - [C0H5W9_HUMAN]
C9JEX1	3	2	43,8	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=4 SV=1 - [C9JEX1_HUMAN]
C9JIZ0	1	1	8,1	LSM8 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=NAA38 PE=4 SV=1 - [C9JIZ0_HUMAN]
C9JL85	3	1	5,7	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=MTPN PE=4 SV=1 - [C9JL85_HUMAN]
C9JLW8	3	2	10,9	Protein FAM195B OS=Homo sapiens GN=FAM195B PE=3 SV=1 - [F195B_HUMAN]
C9JM50	3	2	20,8	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=KRT19 PE=4 SV=1 - [C9JM50_HUMAN]
C9JVL0	1	1	9,1	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=SELENBP1 PE=4 SV=1 - [C9JVL0_HUMAN]
D6RA73	1	1	6,8	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=3 SV=1 - [D6RA73_HUMAN]
D6RAN1	2	2	9,5	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=PDLIM7 PE=4 SV=1 - [D6RAN1_HUMAN]
D6RBV0	1	1	12,9	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=LEMD2 PE=4 SV=1 - [D6RBV0_HUMAN]
E5RFY9	1	1	12,4	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=C1orf198 PE=4 SV=1 - [E5RFY9_HUMAN]
E5RGN3	2	2	6,3	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=ATOX1 PE=4 SV=1 - [E5RGN3_HUMAN]
E7ER14	2	2	16,7	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=VDAC1 PE=4 SV=1 - [E7ER14_HUMAN]
E7EV99	1	1	70,0	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=ADD1 PE=4 SV=1 - [E7EV99_HUMAN]
E7EVX8	1	1	54,7	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=PRPF31 PE=4 SV=1 - [E7EVX8_HUMAN]
E7EWI9	5	4	34,1	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=HNRNPA3 PE=4 SV=1 - [E7EWI9_HUMAN]
E9PBJ4	3	2	27,4	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=4 SV=1 - [E9PBJ4_HUMAN]

E9PE20	1	1	7,7	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=SRP9 PE=4 SV=1 - [E9PE20_HUMAN]
E9PKD1	1	1	47,4	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=TOR1AIP1 PE=4 SV=1 - [E9PKD1_HUMAN]
E9PL32	1	1	10,6	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=CTSB PE=4 SV=1 - [E9PL32_HUMAN]
E9PLJ3	4	3	9,1	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=4 SV=1 - [E9PLJ3_HUMAN]
E9PN25	1	1	14,6	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=3 SV=1 - [E9PN25_HUMAN]
F5GYZ3	1	1	43,8	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=NONO PE=4 SV=1 - [F5GYZ3_HUMAN]
F5GZ51	1	1	18,3	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=C4orf52 PE=4 SV=1 - [F5GZ51_HUMAN]
F5H022	3	1	19,2	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=H1F0 PE=3 SV=1 - [F5H022_HUMAN]
F5H1C3	3	2	11,2	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=ENO2 PE=4 SV=1 - [F5H1C3_HUMAN]
F5H1I8	1	1	54,5	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=XRCC6 PE=4 SV=1 - [F5H1I8_HUMAN]
F5H2R5	1	1	9,8	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=ARHGDIB PE=4 SV=1 - [F5H2R5_HUMAN]
F5H649	1	1	61,5	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=LMOD1 PE=4 SV=1 - [F5H649_HUMAN]
F5H6E2	2	2	118,9	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=MYO1C PE=4 SV=1 - [F5H6E2_HUMAN]
F5H6K0	2	2	89,4	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=DHX15 PE=4 SV=1 - [F5H6K0_HUMAN]
F5H7R9	1	1	6,3	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=PTMS PE=4 SV=1 - [F5H7R9_HUMAN]
F8VSI6	1	1	31,8	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=FLOT1 PE=4 SV=1 - [F8VSI6_HUMAN]
F8VZJ2	3	1	15,0	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=NACA PE=4 SV=1 - [F8VZJ2_HUMAN]
F8VZY5	2	2	38,1	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=KRT7 PE=4 SV=1 - [F8VZY5_HUMAN]
F8W1B7	2	2	22,3	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=MMP14 PE=4 SV=1 - [F8W1B7_HUMAN]

F8W1R7	5	5	16,3	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=4 SV=1 - [F8W1R7_HUMAN]
F8WE77	1	1	10,4	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=GUSB PE=4 SV=1 - [F8WE77_HUMAN]
G3V117	1	1	11,0	Enhancer of yellow 2 homolog (Drosophila), isoform CRA_c OS=Homo sapiens GN=ENY2 PE=4 SV=1 - [G3V117_HUMAN]
G3V1D1	1	1	12,9	Ferritin OS=Homo sapiens GN=FTH1 PE=3 SV=1 - [G3V1D1_HUMAN]
G5E972	3	3	46,3	Thymopoietin, isoform CRA_d OS=Homo sapiens GN=TMPO PE=4 SV=1 - [G5E972_HUMAN]
O00151	2	2	36,0	PDZ and LIM domain protein 1 OS=Homo sapiens GN=PDLIM1 PE=1 SV=4 - [PDLI1_HUMAN]
O00161	1	1	23,3	Synaptosomal-associated protein 23 OS=Homo sapiens GN=SNAP23 PE=1 SV=1 - [SNP23_HUMAN]
O00483	4	3	9,4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=NDUFA4 PE=1 SV=1 - [NDUA4_HUMAN]
O14561	3	2	17,4	Acyl carrier protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=NDUFAB1 PE=1 SV=3 - [ACPM_HUMAN]
O14737	1	1	14,3	Programmed cell death protein 5 OS=Homo sapiens GN=PDCD5 PE=1 SV=3 - [PDCD5_HUMAN]
O14957	2	2	6,6	Cytochrome b-c1 complex subunit 10 OS=Homo sapiens GN=UQCR11 PE=2 SV=1 - [QCR10_HUMAN]
O43678	4	3	10,9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2 OS=Homo sapiens GN=NDUFA2 PE=1 SV=3 - [NDUA2_HUMAN]
O60220	2	2	11,0	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A OS=Homo sapiens GN=TIMM8A PE=1 SV=1 - [TIM8A_HUMAN]
O60664	4	3	47,0	Perilipin-3 OS=Homo sapiens GN=PLIN3 PE=1 SV=3 - [PLIN3_HUMAN]
O60814	2	1	13,9	Histone H2B type 1-K OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BK PE=1 SV=3 - [H2B1K_HUMAN]
O60869	2	1	16,4	Endothelial differentiation-related factor 1 OS=Homo sapiens GN=EDF1 PE=1 SV=1 - [EDF1_HUMAN]
O60884	1	1	45,7	DnaJ homolog subfamily A member 2 OS=Homo sapiens GN=DNAJA2 PE=1 SV=1 - [DNJA2_HUMAN]
O75391	1	1	26,0	Sperm-associated antigen 7 OS=Homo sapiens GN=SPAG7 PE=1 SV=2 - [SPAG7_HUMAN]
O75438	2	2	7,0	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1 OS=Homo sapiens GN=NDUFB1 PE=1 SV=1 - [NDUB1_HUMAN]

O75531	8	2	10,1	Barrier-to-autointegration factor OS=Homo sapiens GN=BANF1 PE=1 SV=1 - [BAF_HUMAN]
O75964	3	3	11,4	ATP synthase subunit g, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5L PE=1 SV=3 - [ATP5L_HUMAN]
P01009	2	1	46,7	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3 - [A1AT_HUMAN]
P01834	4	3	11,6	Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1 - [IGKC_HUMAN]
P02647	9	8	30,8	Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1 - [APOA1_HUMAN]
P02649	3	2	36,1	Apolipoprotein E OS=Homo sapiens GN=APOE PE=1 SV=1 - [APOE_HUMAN]
P02652	3	2	11,2	Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1 SV=1 - [APOA2_HUMAN]
P02654	7	3	9,3	Apolipoprotein C-I OS=Homo sapiens GN=APOC1 PE=1 SV=1 - [APOC1_HUMAN]
P02655	4	3	11,3	Apolipoprotein C-II OS=Homo sapiens GN=APOC2 PE=1 SV=1 - [APOC2_HUMAN]
P02656	4	3	10,8	Apolipoprotein C-III OS=Homo sapiens GN=APOC3 PE=1 SV=1 - [APOC3_HUMAN]
P02671	21	13	94,9	Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2 - [FIBA_HUMAN]
P04075	1	1	39,4	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=2 - [ALDOA_HUMAN]
P04080	2	2	11,1	Cystatin-B OS=Homo sapiens GN=CSTB PE=1 SV=2 - [CYTB_HUMAN]
P04264	7	6	66,0	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]
P04632	1	1	28,3	Calpain small subunit 1 OS=Homo sapiens GN=CAPNS1 PE=1 SV=1 - [CPNS1_HUMAN]
P05109	7	4	10,8	Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1 - [S10A8_HUMAN]
P05387	4	4	11,7	60S acidic ribosomal protein P2 OS=Homo sapiens GN=RPLP2 PE=1 SV=1 - [RLA2_HUMAN]
P06702	7	4	13,2	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1 - [S10A9_HUMAN]
P06703	7	3	10,2	Protein S100-A6 OS=Homo sapiens GN=S100A6 PE=1 SV=1 - [S10A6_HUMAN]

P06733	4	3	47,1	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2 - [ENOA_HUMAN]
P06748	3	2	32,6	Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2 - [NPM_HUMAN]
P07108	9	5	10,0	Acyl-CoA-binding protein OS=Homo sapiens GN=DBI PE=1 SV=2 - [ACBP_HUMAN]
P07195	4	4	36,6	L-lactate dehydrogenase B chain OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=1 SV=2 - [LDHB_HUMAN]
P07311	3	3	11,3	Acylphosphatase-1 OS=Homo sapiens GN=ACYP1 PE=1 SV=2 - [ACYP1_HUMAN]
P07602	6	4	58,1	Proactivator polypeptide OS=Homo sapiens GN=PSAP PE=1 SV=2 - [SAP_HUMAN]
P07711	2	1	37,5	Cathepsin L1 OS=Homo sapiens GN=CTSL1 PE=1 SV=2 - [CATL1_HUMAN]
P07737	3	2	15,0	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2 - [PROF1_HUMAN]
P08670	3	3	53,6	Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4 - [VIME_HUMAN]
P09382	3	1	14,7	Galectin-1 OS=Homo sapiens GN=LGALS1 PE=1 SV=2 - [LEG1_HUMAN]
P09669	3	3	8,8	Cytochrome c oxidase subunit 6C OS=Homo sapiens GN=COX6C PE=1 SV=2 - [COX6C_HUMAN]
P10253	2	2	105,3	Lysosomal alpha-glucosidase OS=Homo sapiens GN=GAA PE=1 SV=4 - [LYAG_HUMAN]
P10599	6	4	11,7	Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN PE=1 SV=3 - [THIO_HUMAN]
P11216	1	1	96,6	Glycogen phosphorylase, brain form OS=Homo sapiens GN=PYGB PE=1 SV=5 - [PYGB_HUMAN]
P13645	18	13	58,8	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]
P14174	6	2	12,5	Macrophage migration inhibitory factor OS=Homo sapiens GN=MIF PE=1 SV=4 - [MIF_HUMAN]
P16401	1	1	22,6	Histone H1.5 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1B PE=1 SV=3 - [H15_HUMAN]
P17096	1	1	11,7	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y OS=Homo sapiens GN=HMGA1 PE=1 SV=3 - [HMGA1_HUMAN]
P17661	1	1	53,5	Desmin OS=Homo sapiens GN=DES PE=1 SV=3 - [DESM_HUMAN]

P18859	11	5	12,6	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5J PE=1 SV=1 - [ATP5J_HUMAN]
P19105	1	1	19,8	Myosin regulatory light chain 12A OS=Homo sapiens GN=MYL12A PE=1 SV=2 - [ML12A_HUMAN]
P20674	8	5	16,8	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=COX5A PE=1 SV=2 - [COX5A_HUMAN]
P22626	2	1	37,4	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2 - [ROA2_HUMAN]
P23246	1	1	76,1	Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens GN=SFPQ PE=1 SV=2 - [SFPQ_HUMAN]
P25705	3	3	59,7	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1 - [ATPA_HUMAN]
P26447	2	1	11,7	Protein S100-A4 OS=Homo sapiens GN=S100A4 PE=1 SV=1 - [S10A4_HUMAN]
P30046	2	2	12,7	D-dopachrome decarboxylase OS=Homo sapiens GN=DDT PE=1 SV=3 - [DOPD_HUMAN]
P31146	1	1	51,0	Coronin-1A OS=Homo sapiens GN=CORO1A PE=1 SV=4 - [COR1A_HUMAN]
P31949	6	2	11,7	Protein S100-A11 OS=Homo sapiens GN=S100A11 PE=1 SV=2 - [S10AB_HUMAN]
P35527	10	10	62,0	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]
P35754	4	3	11,8	Glutaredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=GLRX PE=1 SV=2 - [GLRX1_HUMAN]
P35908	15	13	65,4	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]
P47914	1	1	17,7	60S ribosomal protein L29 OS=Homo sapiens GN=RPL29 PE=1 SV=2 - [RL29_HUMAN]
P47985	1	1	29,6	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=UQCRFS1 PE=1 SV=2 - [UCRI_HUMAN]
P48539	1	1	6,8	Purkinje cell protein 4 OS=Homo sapiens GN=PCP4 PE=2 SV=3 - [PCP4_HUMAN]
P53999	1	1	14,4	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 OS=Homo sapiens GN=SUB1 PE=1 SV=3 - [TCP4_HUMAN]
P54802	1	1	82,2	Alpha-N-acetylglucosaminidase OS=Homo sapiens GN=NAGLU PE=1 SV=2 - [ANAG_HUMAN]
P55265	1	1	136,0	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase OS=Homo sapiens GN=ADAR PE=1 SV=4 - [DSRAD_HUMAN]

P56385	2	2	7,9	ATP synthase subunit e, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5I PE=1 SV=2 - [ATP5I_HUMAN]
P60174	5	3	30,8	Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 PE=1 SV=3 - [TPIS_HUMAN]
P60903	2	2	11,2	Protein S100-A10 OS=Homo sapiens GN=S100A10 PE=1 SV=2 - [S10AA_HUMAN]
P61604	12	6	10,9	10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPE1 PE=1 SV=2 - [CH10_HUMAN]
P61960	6	4	9,1	Ubiquitin-fold modifier 1 OS=Homo sapiens GN=UFM1 PE=1 SV=1 - [UFM1_HUMAN]
P62072	3	1	10,3	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10 OS=Homo sapiens GN=TIMM10 PE=1 SV=1 - [TIM10_HUMAN]
P62158	3	3	16,8	Calmodulin OS=Homo sapiens GN=CALM1 PE=1 SV=2 - [CALM_HUMAN]
P62304	1	1	10,8	Small nuclear ribonucleoprotein E OS=Homo sapiens GN=SNRPE PE=1 SV=1 - [RUXE_HUMAN]
P62306	2	1	9,7	Small nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens GN=SNRPF PE=1 SV=1 - [RUXF_HUMAN]
P62750	1	1	17,7	60S ribosomal protein L23a OS=Homo sapiens GN=RPL23A PE=1 SV=1 - [RL23A_HUMAN]
P62805	5	4	11,4	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2 - [H4_HUMAN]
P62857	3	2	7,8	40S ribosomal protein S28 OS=Homo sapiens GN=RPS28 PE=1 SV=1 - [RS28_HUMAN]
P62861	1	1	6,6	40S ribosomal protein S30 OS=Homo sapiens GN=FAU PE=1 SV=1 - [RS30_HUMAN]
P62942	9	4	11,9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A OS=Homo sapiens GN=FKBP1A PE=1 SV=2 - [FKB1A_HUMAN]
P63173	3	3	8,2	60S ribosomal protein L38 OS=Homo sapiens GN=RPL38 PE=1 SV=2 - [RL38_HUMAN]
P63313	1	1	5,0	Thymosin beta-10 OS=Homo sapiens GN=TMSB10 PE=1 SV=2 - [TYB10_HUMAN]
P68371	9	7	49,8	Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4B PE=1 SV=1 - [TBB4B_HUMAN]
P68871	15	8	16,0	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2 - [HBB_HUMAN]
P69905	12	7	15,2	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2 - [HBA_HUMAN]

P81605	1	1	11,3	Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DCD_HUMAN]
P82909	4	3	11,5	28S ribosomal protein S36, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPS36 PE=1 SV=2 - [RT36_HUMAN]
P84090	1	1	12,3	Enhancer of rudimentary homolog OS=Homo sapiens GN=ERH PE=1 SV=1 - [ERH_HUMAN]
Q01995	6	5	22,6	Transgelin OS=Homo sapiens GN=TAGLN PE=1 SV=4 - [TAGL_HUMAN]
Q02818	2	1	53,8	Nucleobindin-1 OS=Homo sapiens GN=NUCB1 PE=1 SV=4 - [NUCB1_HUMAN]
Q08AG7	1	1	8,5	Mitotic-spindle organizing protein 1 OS=Homo sapiens GN=MZT1 PE=1 SV=2 - [MZT1_HUMAN]
Q09666	31	30	628,7	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK OS=Homo sapiens GN=AHNAK PE=1 SV=2 - [AHNK_HUMAN]
Q14011	4	3	18,6	Cold-inducible RNA-binding protein OS=Homo sapiens GN=CIRBP PE=1 SV=1 - [CIRBP_HUMAN]
Q14061	1	1	6,9	Cytochrome c oxidase copper chaperone OS=Homo sapiens GN=COX17 PE=1 SV=2 - [COX17_HUMAN]
Q14126	1	1	122,2	Desmoglein-2 OS=Homo sapiens GN=DSG2 PE=1 SV=2 - [DSG2_HUMAN]
Q15056	1	1	27,4	Eukaryotic translation initiation factor 4H OS=Homo sapiens GN=EIF4H PE=1 SV=5 - [IF4H_HUMAN]
Q15365	1	1	37,5	Poly(rC)-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PCBP1 PE=1 SV=2 - [PCBP1_HUMAN]
Q15714	2	2	109,6	TSC22 domain family protein 1 OS=Homo sapiens GN=TSC22D1 PE=1 SV=3 - [T22D1_HUMAN]
Q15836	2	1	11,3	Vesicle-associated membrane protein 3 OS=Homo sapiens GN=VAMP3 PE=1 SV=3 - [VAMP3_HUMAN]
Q15843	6	3	9,1	NEDD8 OS=Homo sapiens GN=NEDD8 PE=1 SV=1 - [NEDD8_HUMAN]
Q15847	4	3	7,8	Adipose most abundant gene transcript 2 protein OS=Homo sapiens GN=APM2 PE=1 SV=1 - [APM2_HUMAN]
Q16777	9	3	14,0	Histone H2A type 2-C OS=Homo sapiens GN=HIST2H2AC PE=1 SV=4 - [H2A2C_HUMAN]
Q49AN9	2	1	7,1	SNRPG protein OS=Homo sapiens GN=SNRPG PE=4 SV=1 - [Q49AN9_HUMAN]
Q49B96	1	1	10,4	Cytochrome c oxidase assembly protein COX19 OS=Homo sapiens GN=COX19 PE=1 SV=1 - [COX19_HUMAN]

Q5JTJ3	1	1	14,1	Uncharacterized protein C1orf31 OS=Homo sapiens GN=C1orf31 PE=2 SV=1 - [CA031_HUMAN]
Q5T123	3	2	9,4	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3 OS=Homo sapiens GN=SH3BGRL3 PE=2 SV=1 - [Q5T123_HUMAN]
Q5T4L4	1	1	7,4	Ribosomal protein S27 OS=Homo sapiens GN=RPS27 PE=4 SV=1 - [Q5T4L4_HUMAN]
Q5TBN3	1	1	27,3	Lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin) (Fragment) OS=Homo sapiens GN=LCP1 PE=2 SV=1 - [Q5TBN3_HUMAN]
Q6EEV4	1	1	15,1	DNA-directed RNA polymerase II subunit GRINL1A, isoforms 4/5 OS=Homo sapiens GN=POLR2M PE=2 SV=1 - [GL1AD_HUMAN]
Q6IQ15	5	4	47,8	EEF1A1 protein OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=2 SV=1 - [Q6IQ15_HUMAN]
Q6ZYL4	3	2	8,0	General transcription factor IIH subunit 5 OS=Homo sapiens GN=GTF2H5 PE=1 SV=1 - [TF2H5_HUMAN]
Q86V81	3	2	26,9	THO complex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=THOC4 PE=1 SV=3 - [THOC4_HUMAN]
Q86XW9	1	1	36,8	Thioredoxin domain-containing protein 6 OS=Homo sapiens GN=NME9 PE=1 SV=1 - [TXND6_HUMAN]
Q8IUE6	2	2	14,0	Histone H2A type 2-B OS=Homo sapiens GN=HIST2H2AB PE=1 SV=3 - [H2A2B_HUMAN]
Q8NAN9	1	1	21,4	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=DPYSL2 PE=2 SV=1 - [Q8NAN9_HUMAN]
Q8NC51	3	2	44,9	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Homo sapiens GN=SERBP1 PE=1 SV=2 - [PAIRB_HUMAN]
Q8NFU3	1	1	12,5	Thiosulfate sulfurtransferase/rhodanese-like domain- containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=TSTD1 PE=1 SV=3 - [TSTD1_HUMAN]
Q8NHZ8	3	3	9,8	Anaphase-promoting complex subunit CDC26 OS=Homo sapiens GN=CDC26 PE=1 SV=1 - [CDC26_HUMAN]
Q8TCE1	3	2	29,1	SERPINC1 protein OS=Homo sapiens GN=SERPINC1 PE=2 SV=1 - [Q8TCE1_HUMAN]
Q8WVC2	5	3	8,8	40S ribosomal protein S21 OS=Homo sapiens GN=RPS21 PE=2 SV=1 - [Q8WVC2_HUMAN]
Q8WW12	2	2	18,9	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein OS=Homo sapiens GN=PCNP PE=1 SV=2 - [PCNP_HUMAN]
Q8WXC6	2	1	6,2	Myeloma-overexpressed gene 2 protein OS=Homo sapiens GN=MYEOV2 PE=2 SV=3 - [MYOV2_HUMAN]
Q96B49	4	2	8,0	Mitochondrial import receptor subunit TOM6 homolog OS=Homo sapiens GN=TOMM6 PE=1 SV=1 - [TOM6_HUMAN]

Q96CT7	2	2	25,8	Coiled-coil domain-containing protein 124 OS=Homo sapiens GN=CCDC124 PE=1 SV=1 - [CC124_HUMAN]
Q96FQ6	5	4	11,8	Protein S100-A16 OS=Homo sapiens GN=S100A16 PE=1 SV=1 - [S10AG_HUMAN]
Q96KK5	9	3	13,9	Histone H2A type 1-H OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AH PE=1 SV=3 - [H2A1H_HUMAN]
Q96RF0	1	1	68,9	Sorting nexin-18 OS=Homo sapiens GN=SNX18 PE=1 SV=2 - [SNX18_HUMAN]
Q99417	3	3	12,0	C-Myc-binding protein OS=Homo sapiens GN=MYCBP PE=1 SV=3 - [MYCBP_HUMAN]
Q99497	2	2	19,9	Protein DJ-1 OS=Homo sapiens GN=PARK7 PE=1 SV=2 - [PARK7_HUMAN]
Q99584	4	4	11,5	Protein S100-A13 OS=Homo sapiens GN=S100A13 PE=1 SV=1 - [S10AD_HUMAN]
Q9BRP8	2	2	22,6	Partner of Y14 and mago OS=Homo sapiens GN=WIBG PE=1 SV=1 - [WIBG_HUMAN]
Q9BTE9	2	1	109,2	NUMA1 protein OS=Homo sapiens GN=NUMA1 PE=2 SV=1 - [Q9BTE9_HUMAN]
Q9BUF9	1	1	13,9	Myosin, light chain 9, regulatory OS=Homo sapiens GN=MYL9 PE=2 SV=1 - [Q9BUF9_HUMAN]
Q9BW30	1	1	19,0	Tubulin polymerization-promoting protein family member 3 OS=Homo sapiens GN=TPPP3 PE=1 SV=1 - [TPPP3_HUMAN]
Q9C0C2	1	1	181,7	182 kDa tankyrase-1-binding protein OS=Homo sapiens GN=TNKS1BP1 PE=1 SV=4 - [TB182_HUMAN]
Q9H0N5	1	1	14,4	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase 2 OS=Homo sapiens GN=PCBD2 PE=1 SV=4 - [PHS2_HUMAN]
Q9H1E3	3	2	27,3	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate OS=Homo sapiens GN=NUCKS1 PE=1 SV=1 - [NUCKS_HUMAN]
Q9H3K6	1	1	10,1	Bola-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=BOLA2 PE=1 SV=1 - [BOLA2_HUMAN]
Q9NP97	2	2	10,9	Dynein light chain roadblock-type 1 OS=Homo sapiens GN=DYNLRB1 PE=1 SV=3 - [DLRB1_HUMAN]
Q9NSA3	4	2	9,2	Beta-catenin-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=CTNNBIP1 PE=1 SV=1 - [CNBP1_HUMAN]
Q9UBR2	1	1	33,8	Cathepsin Z OS=Homo sapiens GN=CTS2 PE=1 SV=1 - [CATZ_HUMAN]
Q9UHD8	1	1	65,4	Septin-9 OS=Homo sapiens GN=SEPT9 PE=1 SV=2 - [SEPT9_HUMAN]

Q9UIL1	1	1	18,0	Short coiled-coil protein OS=Homo sapiens GN=SCOC PE=1 SV=2 - [SCOC_HUMAN]
Q9UK45	1	1	11,6	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7 OS=Homo sapiens GN=LSM7 PE=1 SV=1 - [LSM7_HUMAN]
Q9UM22	1	1	25,4	Mammalian ependymin-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=EPDR1 PE=1 SV=2 - [EPDR1_HUMAN]
Q9UMS6	1	1	117,4	Synaptopodin-2 OS=Homo sapiens GN=SYNPO2 PE=1 SV=2 - [SYNP2_HUMAN]
Q9Y2S6	1	1	7,1	Coiled-coil domain-containing protein 72 OS=Homo sapiens GN=CCDC72 PE=1 SV=1 - [CCD72_HUMAN]
Q9Y4Y9	6	3	9,9	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm5 OS=Homo sapiens GN=LSM5 PE=1 SV=3 - [LSM5_HUMAN]
Q9Y5J9	1	1	9,3	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 B OS=Homo sapiens GN=TIMM8B PE=1 SV=1 - [TIM8B_HUMAN]
Q9Y5L4	4	3	10,5	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13 OS=Homo sapiens GN=TIMM13 PE=1 SV=1 - [TIM13_HUMAN]
Q9Y6M5	1	1	55,3	Zinc transporter 1 OS=Homo sapiens GN=SLC30A1 PE=1 SV=3 - [ZNT1_HUMAN]

Table S1 Summary of the proteins identified by LC-MS/MS.

Gene ID	Gene Name	Fold Change	FDR (%)
213110_s_at	COL4A5	2.57	3.76
213992_at	COL4A6	6.04	3.76
214702_at	FN1	2.76	3.76
226701_at	GJA5	3.01	3.76
238778_at	MPP7	3.17	3.76
204620_s_at	VCAN	2.12	3.76
240467_at	AA947873	2.03	3.76
205609_at	ANGPT1	2.17	0
230925_at	APBB1IP	3.22	3.76
1553801_a_at	C14orf126	2.37	3.76
224604_at	C4orf3	2.12	3.76
228967_at	EIF1	2.5	3.76
209537_at	EXTL2	2.5	3.76
227996_at	FARP1	2.44	3.76
210299_s_at	FHL1	2.17	3.76
238808_at	HOXA13	2.5	3.76
1557286_at	Hs.138760	2.17	3.76
1559062_at	Hs.158580	2.11	3.76
241310_at	Hs.161354	3.24	3.76
242181_at	Hs.31841	3.11	3.76
226134_s_at	Hs.596757	2.94	3.76
239671_at	Hs.614930	2.05	3.76
212325_at	LIMCH1	2.64	3.76
1557161_at	LOC100132735	2.22	3.76
219032_x_at	OPN3	3.12	3.76
235197_s_at	OSTM1	2.08	3.76
219738_s_at	PCDH9	6.99	3.76
242905_at	PNO1	2.04	3.76
211057_at	ROR1	5.36	3.76
206950_at	SCN9A	2.79	3.76
204430_s_at	SLC2A5	3.19	3.76
226178_at	SOCS4	2.16	0
209197_at	SYT11	2.11	3.76
242258_at	ZBTB1	2.07	3.76
213471_at	NPHP4	-2.28	0
200872_at	S100A10	-4.45	0
225061_at	DNAJA4	-2.14	0

Table S2 List of genes that are differentially expressed in HEECs transduced with S100A10 shRNAs compared to control shRNA.

Gene ID	Gene Name	Fold Change	FDR (%)
237466_s_at	HHIP	9.33	0
231804_at	RXFP1	7.47	2.51
218499_at	MST4	6.86	4.1
215717_s_at	FBN2	5.81	3.8
203485_at	RTN1	5.8	4.64
223044_at	SLC40A1	5.75	2.84
202156_s_at	CELF2	5.66	4.1
202435_s_at	CYP1B1	5.63	2.16
202286_s_at	TACSTD2	4.92	3.8
228186_s_at	RSPO3	4.9	0
209866_s_at	LPHN3	4.78	4.53
206765_at	KCNJ2	4.72	3.8
225207_at	PKD4	4.68	2.16
1568604_a_at	CADPS	4.56	2.19
205767_at	EREG	4.52	4.29
204466_s_at	SNCA	4.48	4.1
231513_at	Hs.597550	4.38	2.84
235681_at	Hs.130853	4.35	2.51
1552736_a_at	NETO1	4.31	4.29
221916_at	NEFL	4.27	2.19
209875_s_at	SPP1	4.22	2.84
232573_at	FBXO32	4.21	4.29
209242_at	PEG3	3.98	4.1
204614_at	SERPINB2	3.95	0
201107_s_at	THBS1	3.91	4.29
209555_s_at	CD36	3.85	2.84
228885_at	MAMDC2	3.75	2.84
228329_at	DAB1	3.75	4.97
209335_at	DCN	3.74	2.51
229823_at	RIMS2	3.66	4.1
215664_s_at	EPHA5	3.61	3.8
241824_at	FOSL2	3.54	2.19
232636_at	SLITRK4	3.54	2.16
227048_at	LAMA1	3.42	0
219368_at	NAP1L2	3.41	4.29
223204_at	FAM198B	3.4	2.19
237484_at	C12orf69	3.39	3.05
229084_at	CNTN4	3.39	4.1

227282_at	PCDH19	3.36	3.8
240259_at	LOC100506718	3.35	2.19
209840_s_at	LRRN3	3.34	2.84
203819_s_at	IGF2BP3	3.28	0
241763_s_at	BF244402	3.27	2.51
237737_at	LOC100289026	3.26	3.8
202388_at	RGS2	3.25	0
212952_at	LOC100507328	3.2	3.8
37892_at	COL11A1	3.19	4.1
210365_at	RUNX1	3.19	3.05
1559060_a_at	FNIP1	3.17	3.05
205352_at	SERPINI1	3.06	3.8
206114_at	EPHA4	3.04	2.51
242852_at	LOC285147	3.02	2.51
203917_at	CXADR	3	2.16
203716_s_at	DPP4	2.99	3.8
226420_at	MECOM	2.97	2.51
217714_x_at	STMN1	2.97	4.64
1559462_at	Hs.446446	2.94	4.29
214079_at	DHRS2	2.94	4.29
210387_at	HIST1H2BG	2.94	4.29
210674_s_at	PCDHA1 /// PCDHA10 /// PCDHA11 /// PCDHA12 /// PCDHA13 /// PCDHA2 /// PCDHA3 /// PCDHA4 /// PCDHA5 /// PCDHA6 /// PCDHA7 /// PCDHA8 /// PCDHA9 /// PCDHAC1 /// PCDHAC2	2.93	4.97
208167_s_at	MMP16	2.93	4.1
213992_at	COL4A6	2.86	2.84
219049_at	CSGALNACT1	2.85	3.8
1563182_at	ACVR1C	2.85	3.8
206834_at	HBD	2.84	4.97
218353_at	RGS5	2.83	2.51
244463_at	ADAM23	2.81	2.84
217901_at	DSG2	2.78	4.97
232523_at	MEGF10	2.76	4.53

226281_at	DNER	2.74	4.29
210524_x_at	AF078844	2.7	2.19
206858_s_at	HOXC6	2.69	2.51
236044_at	PPAPDC1A	2.67	2.19
205278_at	GAD1	2.66	4.64
205923_at	RELN	2.65	4.53
230793_at	LRRC16A	2.65	2.51
238803_at	HECTD2	2.63	4.1
222787_s_at	TMEM106B	2.63	0
228635_at	PCDH10	2.6	3.8
212592_at	IGJ	2.59	3.8
225809_at	PARM1	2.59	4.64
205826_at	MYOM2	2.58	3.8
202035_s_at	SFRP1	2.57	2.16
213629_x_at	MT1F	2.56	0
239835_at	KBTBD8	2.54	2.51
237016_at	TMEM217	2.54	3.05
229160_at	MUM1L1	2.54	3.05
214657_s_at	NEAT1	2.54	2.16
218807_at	VAV3	2.52	3.05
210319_x_at	MSX2	2.52	2.51
1568807_a_at	Hs.600720	2.52	4.53
202450_s_at	CTSK	2.52	3.05
236088_at	NTNG1	2.49	2.16
219274_at	TSPAN12	2.49	4.1
211696_x_at	HBB	2.46	4.64
200951_s_at	CCND2	2.46	4.97
204464_s_at	EDNRA	2.44	2.84
214639_s_at	HOXA1	2.43	2.16
202644_s_at	TNFAIP3	2.42	2.19
201348_at	GPX3	2.4	4.29
214472_at	HIST1H2AD /// HIST1H3D	2.39	4.53
225667_s_at	FAM84A	2.38	4.1
210675_s_at	PTPRR	2.37	2.19
214807_at	Hs.99472	2.37	4.97
228708_at	RAB27B	2.36	4.1
213791_at	PENK	2.35	4.53
204622_x_at	NR4A2	2.34	4.29
228790_at	FAM110B	2.34	0

214817_at	UNC13A	2.33	4.1
242576_x_at	N4BP2L2	2.33	4.53
242437_at	ZNF720	2.32	4.97
205399_at	DCLK1	2.31	4.1
202508_s_at	SNAP25	2.31	2.19
202935_s_at	SOX9	2.3	2.19
202887_s_at	DDIT4	2.29	4.64
240269_at	MGC16169	2.29	4.53
235740_at	MCTP1	2.29	3.8
232035_at	LOC100507025	2.28	4.1
223000_s_at	F11R	2.28	4.53
1560286_s_at	Hs.369398	2.28	4.64
230560_at	STXBP6	2.26	4.53
230645_at	FRMD3	2.26	2.51
216259_at	BMPER	2.26	4.97
227084_at	DTNA	2.26	2.16
205226_at	PDGFRL	2.25	2.51
1561969_at	ZPLD1	2.24	4.97
231867_at	ODZ2	2.24	2.84
232226_at	LRRC4C	2.24	4.97
204620_s_at	VCAN	2.23	4.1
221009_s_at	ANGPTL4	2.23	3.05
235924_at	Hs.587362	2.22	3.05
205669_at	NCAM2	2.22	2.84
230082_at	LOC100133660	2.21	2.19
213247_at	SVEP1	2.21	4.29
1554062_at	XG	2.21	3.8
227870_at	IGDCC4	2.21	4.29
230250_at	PTPRB	2.19	2.84
222376_at	Hs.593745	2.16	3.8
210426_x_at	RORA	2.15	4.53
219032_x_at	OPN3	2.15	0
1558508_a_at	C1orf53	2.15	2.19
226492_at	SEMA6D	2.14	3.8
209793_at	GRIA1	2.14	2.51
219983_at	HRASLS	2.14	4.97
220399_at	NCRNA00115	2.14	4.29
204359_at	FLRT2	2.14	2.51
235238_at	SHC4	2.13	2.19

230968_at	Hs.444785	2.13	4.53
212190_at	SERPINE2	2.11	4.29
216092_s_at	SLC7A8	2.11	2.19
243610_at	C9orf135	2.11	4.97
212094_at	PEG10	2.11	2.19
209839_at	DNM3	2.11	4.97
222853_at	FLRT3	2.11	3.8
203786_s_at	TPD52L1	2.1	4.1
222001_x_at	LOC728855	2.1	2.19
205968_at	KCNS3	2.1	0
237058_x_at	SLC6A13	2.1	4.1
1558560_s_at	BLZF1	2.1	0
1570155_at	Hs.615028	2.09	4.1
223159_s_at	NEK6	2.08	2.16
1557374_at	ABCC9	2.08	4.53
229816_at	WDR78	2.07	4.64
205239_at	AREG	2.06	3.8
229340_at	NKAPL	2.06	4.29
204385_at	KYNU	2.05	4.53
200986_at	SERPING1	2.04	3.05
1561604_at	Hs.539926	2.03	4.97
227662_at	SYNPO2	2.03	2.19
202709_at	FMOD	2.03	4.53
215242_at	PIGC	2.03	4.53
217574_at	CDH8	2.03	4.64
214762_at	ATP6V1G2	2.02	4.53
242507_at	UBXD7	2.02	4.97
224448_s_at	C6orf125	-2	4.97
219511_s_at	SNCAIP	-2.01	4.97
204305_at	MIPEP	-2.03	4.64
230958_s_at	Hs.633598	-2.03	4.05
217287_s_at	TRPC6	-2.03	4.97
235052_at	ZNF792	-2.05	4.97
235348_at	ABHD13	-2.06	4.1
205590_at	RASGRP1	-2.07	4.97
1552275_s_at	PXK	-2.07	4.53
203879_at	PIK3CD	-2.07	4.64
208998_at	UCP2	-2.08	4.97
202856_s_at	SLC16A3	-2.08	4.29

244849_at	SEMA3A	-2.09	3.05
211958_at	IGFBP5	-2.09	4.97
235048_at	FAM169A	-2.09	4.05
202470_s_at	CPSF6	-2.1	4.97
201555_at	MCM3	-2.11	4.97
201286_at	SDC1	-2.11	4.05
225578_at	MZT1	-2.12	4.53
206969_at	KRT34	-2.13	3.05
204742_s_at	PDS5B	-2.14	3.83
200832_s_at	SCD	-2.14	3.83
202763_at	CASP3	-2.15	4.97
226955_at	AFAP1L1	-2.16	4.97
225612_s_at	B3GNT5	-2.16	4.97
215997_s_at	CUL4B	-2.17	3.83
222476_at	CNOT6	-2.17	3.83
227748_at	RBMXL1	-2.19	4.53
203399_x_at	PSG3	-2.19	3.05
226665_at	AHSA2	-2.26	4.29
237411_at	ADAMTS6	-2.28	4.05
201467_s_at	NQO1	-2.28	4.64
204935_at	PTPN2	-2.3	4.97
209738_x_at	PSG6	-2.33	4.05
209087_x_at	MCAM	-2.35	4.1
200862_at	DHCR24	-2.35	3.05
213248_at	LOC730101	-2.37	4.97
227420_at	TNFAIP8L1	-2.39	4.97
203046_s_at	TIMELESS	-2.41	4.97
208657_s_at	SEPT9	-2.43	4.64
210005_at	GART	-2.45	4.1
227145_at	LOXL4	-2.47	4.97
239692_at	ILKAP	-2.48	4.64
235295_at	Hs.503584	-2.49	4.29
209594_x_at	PSG9	-2.49	3.02
205961_s_at	PSIP1	-2.5	4.64
201626_at	INSIG1	-2.52	3.83
203837_at	MAP3K5	-2.54	4.97
209815_at	PTCH1	-2.55	4.29
227396_at	PTPRJ	-2.55	3.83
212942_s_at	KIAA1199	-2.57	0

1558001_s_at	ARID5B	-2.57	4.97
203320_at	SH2B3	-2.62	4.97
204830_x_at	PSG5	-2.64	3.02
235019_at	CPM	-2.64	4.97
213610_s_at	KLHL23	-2.64	4.64
209754_s_at	TMPO	-2.67	4.97
232224_at	MASP1	-2.67	4.97
235846_at	RAD54B	-2.69	4.97
238492_at	Hs.597376	-2.69	4.53
226037_s_at	TAF9B	-2.74	4.97
237480_at	Hs.213049	-2.75	4.53
206653_at	POLR3G	-2.77	4.97
208191_x_at	PSG4	-2.94	4.05
224701_at	PARP14	-2.97	4.05
231067_s_at	AKAP12	-3.02	4.53
218804_at	ANO1	-3.12	3.83
227812_at	TNFRSF19	-3.26	4.64
206467_x_at	RTEL1 /// TNFRSF6B	-3.29	4.97
226722_at	FAM20C	-3.32	4.97
1552487_a_at	BNC1	-3.37	4.97
208134_x_at	PSG2	-3.48	4.97
242786_at	LOC283104	-3.54	4.97
205602_x_at	PSG7	-3.62	4.64
213075_at	OLFML2A	-3.67	3.83
205479_s_at	PLAU	-3.99	4.97
53991_at	DENND2A	-4.29	4.97
208483_x_at	KRT33A	-4.36	4.05
208257_x_at	PSG1	-4.97	4.53
212236_x_at	KRT17	-5.33	4.97
228335_at	CLDN11	-8.31	4.97
200872_at	S100A10	-9.14	0

Table S3 List of genes that are differentially expressed in HESCs transduced with S100A10 shRNAs compared to control shRNA.

	Clone ID	DNA sequence
shRNA 1	TRCN0000053841	ACCTGAGAGTACTCATGGAAA
shRNA 2	TRCN0000053839	CCATGATGTTTACATTTCACA
shRNA 3	TRCN0000053838	CCATTGCATGCAATGACTATT

Table S4 DNA sequences of the three shRNAs targeting S100A10.

Gene	Sequence (5'→ 3')
S100A10_F	GGGCTTCCAGAGCTTCTTTT
S100A10_R	CTTCTATGGGGAAGCTGTG
S100A11_F	ATCGAGTCCCTGATTGCTGT
S100A11_R	CCATCACTGTTGGTGTCCAG
PRL_F	TGCAGATGGCTGATGAAGAG
PRL_R	TGCAATGGAACGGATCATTA
CX43_F	AATTCAGACAAGGCCACAG
CX43_R	CATGGCTTGATTCCCTGACT
HPRT1_F	GCCAGACTTTGTTGGATTGTA
HPRT1_R	AAGCAGATGGCCACAGAACT

Table S5 Sequence of the primers used for RT-qPCR.

Chapitre 3 Implantation du Win-Test au sein de la clinique d'assistance médicale à la procréation 'OVO' à Montréal, Canada et étude prospective de la réceptivité endométriale de patientes en cycle naturel

Contexte

L'implantation du Win-Test dans différents centres d'AMP est une étape indispensable à l'évaluation de l'efficacité d'un test en vue d'une potentielle commercialisation. En effet, le caractère multicentrique, c'est-à-dire le fait que l'étude se déroule simultanément dans plusieurs lieux différents, est également un caractère de qualité, permettant l'étude d'un plus grand nombre d'échantillons tout en limitant des biais de sélection géographiques, climatiques ou ethniques. La clinique OVO fertilité, fondée en 2003, offre des services respectant les plus hauts standards de qualité, en favorisant une prise en charge personnalisée. Depuis 2008, le département de Recherche & Développement d'OVO se consacre activement à l'amélioration des connaissances dans les domaines de la fertilité. L'implantation du Win-Test à OVO a un objectif double: i) valider la faisabilité du Win-Test dans un autre centre d'AMP, ii) faire de OVO un centre de référence pour le Win-Test permettant la distribution de ce dernier sur le continent américain.

Dans ce contexte, la mise en place du Win-Test au sein de OVO a nécessité, dans un premier temps, une validation et approbation du projet par le comité d'éthique d'OVO. Dans un deuxième temps, en vue des différences de matériel et d'équipements relatives à la technologie de qPCR entre le centre OVO (ovo labo) et celui de Montpellier, de nombreuses étapes de mise au point et de validations techniques du test ont été nécessaires. D'ailleurs, la datation du jour d'ovulation au sein de la clinique OVO est réalisée par la mesure quotidienne de la température basale corporelle (TBC) matinale des femmes. Or, cette méthode est insuffisante pour déterminer avec précision le jour de l'ovulation (Martinez *et al.*, 1992). Un dosage de la LH permet de dater plus précisément le jour de l'ovulation, et donc par défaut, la fenêtre d'implantation qui se situe 7 à 10 jours après le pic de LH. Par conséquent, la comparaison de l'estimation de la datation de la fenêtre d'implantation par le suivi de la TBC et le dosage de la LH semblait pertinente. Une fois le Win-test opérationnel, nous avons analysé la prévalence d'endomètres réceptifs pendant la fenêtre théorique d'implantation dans une population de patientes en cycle naturel en attente d'un cycle d'ICSI/FIV.

Matériel et méthode

Caractéristiques des patientes

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique OVO (ovo ethix), les patientes recrutées ont signé un formulaire de consentement éclairé. Au total, 143 patientes ont été initialement recrutées pour ce projet, entre avril 2014 et mai 2015. Les critères d'inclusion des patientes sont les suivants: patientes âgées de 18 à 39 ans (33.01 ± 3.82 ans), en attente d'une tentative de FIV ou d'ICSI (1.71 ± 1 rang de tentative), cycles menstruels réguliers (26-36 jours), cavité utérine normale validée par échographie, sonohystérographie ou hystérocopie. Les patients ont été pris en charge pour les raisons suivantes d'infertilité: réserve ovarienne diminuée ($n=7$), facteur tubaire ($n=21$), problème ovulatoire ($n=13$), raisons mixtes ($n=23$), idiopathique ($n=40$) ou anomalie des spermatozoïdes ($n=39$). Les patientes présentant des pathologies utérines (endométrite chronique, endométriose, hydrosalpinx, synéchie utérine ou syndrome d'Asherman, fibrome sous-muqueux ou polype intra-cavitaire supérieur à 1cm) ou prises en charge dans le cadre de don d'ovocytes, ont été exclues de cette présente recherche. Sur les 143 patientes initialement recrutées, 73 ont eu un monitoring de leur cycle par une courbe de la TBC et le dosage de la LH, alors que 41 et 9 patientes ont eu exclusivement le suivi de la TBC et le dosage de la LH, respectivement (figure 1). Les patientes ayant eu un suivi simple par dosage LH, avaient soit de la fièvre lors du cycle à l'étude ou soit avaient des contraintes personnelles les empêchant de prendre leur TBC quotidiennement. Seules les patientes ($n=82$) ayant bénéficié des deux approches ($n=73$) ou du dosage de la LH ($n=9$) ont été retenues pour la présente recherche.

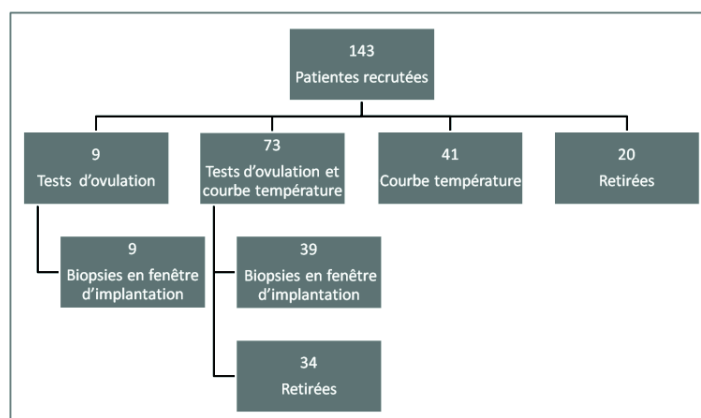


Figure 1 Bilan des patientes recrutées pour le présent projet de recherche, selon que le monitoring du cycle naturel ait été effectué en suivi de la TBC ou par le dosage de la LH.

Biopsie de l'endomètre pendant la fenêtre théorique d'implantation

La biopsie endométriale a été planifiée lors d'un cycle menstruel naturel sans aucun traitement hormonal. Lors du suivi du cycle par la TBC, il a été demandé aux patientes de prendre leur température buccale le matin à la même heure, et ce avant de se lever ou de s'agiter. Ces températures sont inscrites sur un site web spécialisé dans le suivi de la fertilité (mamanandco.fr) et ce graphique (la courbe de température) a été évalué quotidiennement. Cette courbe est généralement bi-phasique : la température la plus basse (nadir) précède l'ovulation, ensuite la rupture du follicule est habituellement suivie par une ascension thermique de 0.5 à 1°C, subséquemment la température se maintient élevée pendant la phase lutéale, c'est le plateau hyperthermique. Ainsi la diminution de la TBC, suivie par une montée permet d'estimer la journée de l'ovulation, tout en se basant sur la date des dernières menstruations. Pour le dosage de la LH, des tests d'ovulation urinaires (First response) ont été utilisés, le premier jour d'utilisation du test est déterminé selon la durée moyenne des cycles (par exemple à partir du 11^e jour pour des cycles de 26 jours, ou du 19^e pour des cycles de 36 jours). Une biopsie de l'endomètre a été effectuée chez 48 patientes pendant la fenêtre théorique d'implantation, entre LH+7 et LH+9, à l'aide d'une pipelle de Cornier (Advance Surgi-Pharm, Dorval, Canada). Après rinçage au tampon phosphate salin (PBS), les biopsies ont été placées individuellement dans un cryotube, congelées et stockées dans de l'azote liquide jusqu'à l'extraction des ARN totaux (ARNt). Les protocoles d'extraction d'ARNt et de qPCR du Win-Test sont détaillés dans Haouzi *et al.*, 2014 ; 2015 *in press*.

Optimisation de la qPCR

La qPCR relative au Win-Test a initialement été mise en place avec l'appareil de chez Roche, le LightCycler 480. Le design de la plaque de qPCR comprenant 384 puits a donc été réalisé en fonction de l'utilisation de cet appareil ainsi que de l'accessibilité à une distribution robotisée (utilisation d'un automate de pipetage Eppendorf) des échantillons. Dans un premier temps, sachant que ovo labo était équipée de l'appareil qPCR de chez Bio-Rad (CFX96), jumelé avec une tête adaptée pour des plaques de qPCR de 96 puits, il a donc fallu re-designer les plaques qPCR du Win-Test de façon à ce qu'elles soient compatibles avec cet appareil. L'utilisation de 4 plaques de 96 puits est donc nécessaire pour pratiquer le Win-Test d'une patiente avec cet appareil de chez Bio-Rad, contre une plaque de 384 puits avec l'appareil de chez Roche. Les réactifs nécessaires à la qPCR sont en général commercialisés par les mêmes fournisseurs d'appareil de qPCR. Il a donc fallu adapter le Win-Test aux réactifs de chez Bio-Rad. Finalement, après quelques mois de mise au

point, la pratique du Win-Test avec le système de chez Bio-Rad est opérationnelle avec une grande reproductibilité inter-tests et inter-laboratoires.

Résultats

Estimation de la fenêtre d'implantation: cycle monitoré par la courbe TBC *versus* dosage de la LH, chez des mêmes patientes

Sur les 73 patientes ayant eu un suivi de cycle naturel par la TBC et le dosage de la LH, 34 ont été retirées de l'étude parce que, soit leur biopsie a été effectuée en dehors de la fenêtre d'implantation (2 à LH+6), soit le pic de LH n'a pu être détecté ou la patiente était dans l'impossibilité de se présenter pour la biopsie pendant la fenêtre d'implantation théorique. Toutes les patientes ayant eu recours à un suivi uniquement par la TBC ont été exclues de la présente étude (n=41). D'autre part, 20 patientes supplémentaires ont été retirées pour diverses raisons: grossesse spontanée pendant le cycle naturel, tentative programmée de FIV annulée ou retrait pour des raisons personnelles. *In fine*, 48 patientes sont éligibles pour cette étude avec une biopsie effectuée entre LH+7 et LH+9 (23 à LH+7, 24 à LH+8, 1 à LH+9), dont 39 en suivi double (TBC et dosage LH) et 9 en suivi simple (dosage LH).

Chez les 39 patientes ayant eu un double suivi, la comparaison des estimations de la date d'ovulation appréciables par la TBC et le dosage de la LH, montre un décalage de 24 à 48 heures entre la date estimée par la TBC en comparaison au dosage de la LH dans 48,7% des patientes (figure 2).

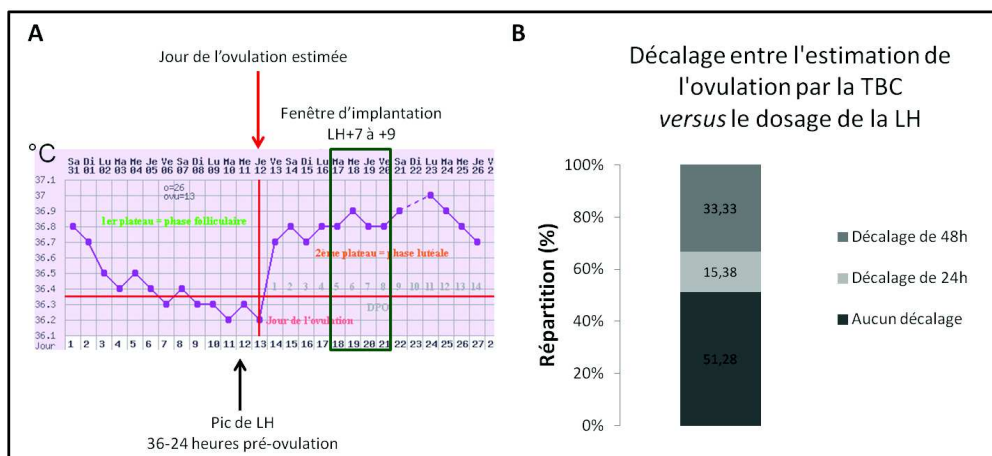


Figure 2 Courbe de la TBC typique (mamanandco.fr). Dans cet exemple, l'ovulation est estimée le jour où la montée de la TBC débute, au 13^e jour du cycle (A). Pourcentage de patientes montrant un décalage de 0, 24 ou 48 heures entre le jour de l'ovulation estimé avec la TBC *versus* le dosage de la LH (B).

Prévalence d'endomètres réceptifs pendant la fenêtre théorique d'implantation

Dans un premier temps, nous avons analysé la répartition des différents statuts de la réceptivité endométriale des patientes dont les biopsies ont été prélevées à un même moment de la fenêtre théorique d'implantation. Parmi les 23 patientes dont les endomètres ont été évalués à LH+7, 56% présentent un endomètre réceptif, 35% un endomètre partiellement réceptif et 9% un endomètre non-réceptif (figure 3). A LH+8 (n=24), 79%, 4% et 17% des patientes ont un endomètre réceptif, partiellement réceptif et non-réceptif respectivement (figure 3). D'autre part, 58% des patients dont l'endomètre a été évalué réceptif le sont à LH+8 contre 39% à LH+7 (figure 4).

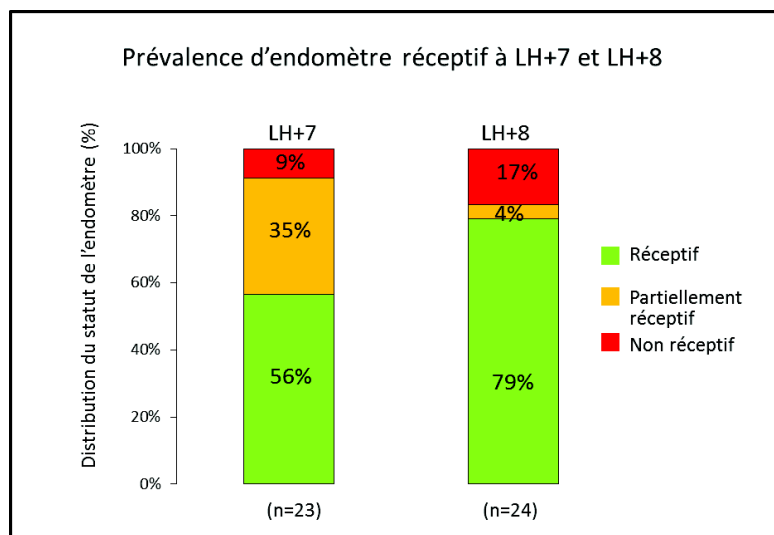


Figure 3 Prévalence du statut de la réceptivité selon le jour du prélèvement endométrial

Corrélation entre le statut de l'endomètre et paramètres médicaux

Nous avons analysé la corrélation entre le statut de l'endomètre et l'âge de la patiente, la cause d'infertilité et le rang de tentatives de FIV ou d'ICSI des patientes. Aucune corrélation entre ces différents paramètres n'a pu être établie.

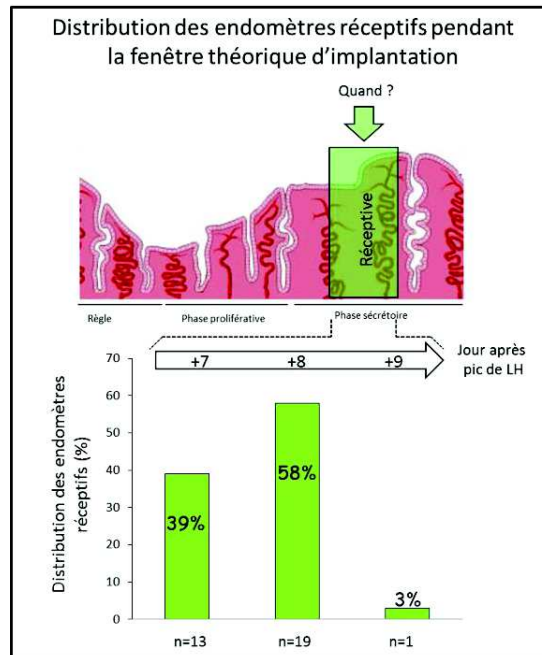


Figure 4 Distribution du jour du prélèvement de l'endomètre chez les patientes diagnostiquées réceptives.

Discussion

Dans le cadre de ce projet, nous avons tout d'abord atteint notre premier objectif, soit de valider la faisabilité du Win-Test dans un centre d'AMP autre que le centre de Montpellier. Nous avons choisi de nous associer avec la clinique d'AMP Canadienne, OVO fertilité. Cette clinique est un partenaire judicieux pour la mise en place du Win-Test principalement vu son département de Recherche & Développement qui a pour mandat de développer de nouveaux outils diagnostiques, d'améliorer les connaissances médicales et de fournir aux patients davantage d'options de traitements. Lors de la mise en place du test diagnostique une période d'optimisation et de validation a été nécessaire afin d'adapter les techniques de RT-qPCR aux instruments disponibles. Ensuite nous avons procédé à un changement de pratique au niveau du monitoring des cycles des patientes pour le prélèvement endométrial. Au début de ce projet, le monitoring des cycles des patientes était effectué par un suivi de la TBC afin d'estimer l'ovulation et d'en déduire la fenêtre d'implantation. Non seulement le suivi des courbes de TBC des patientes s'est avéré complexe, mais nous nous sommes rendu compte de son manque de fiabilité en terme d'estimation de la date d'ovulation, et par conséquent, de la fenêtre d'implantation. Ainsi, nous avons choisi d'instaurer l'utilisation de tests d'ovulation (LH) afin de monitorer le cycle menstruel des patientes simultanément aux suivis par la TBC, afin de confirmer le manque de précision de la courbe de TBC pour estimer la fenêtre d'implantation.

Le suivi du cycle naturel par une courbe de la TBC, est associé à plusieurs contraintes. Par exemple, certaines femmes peuvent ovuler sans augmentation significative de la TBC (Morris *et al.*, 1976). D'autre part, l'ovulation peut être décalée de quelques jours par rapport au point où la TBC est à son plus bas (nadir) (Quagliarello et Arny 1986). Enfin, chez certaines femmes, la courbe est impossible à interpréter en vue de la présence de variations et de plusieurs plateaux thermiques. Dans la présente étude, nous avons trouvé que l'estimation de l'ovulation par la TBC, ne permet pas d'estimer avec précision la date d'ovulation en comparaison du dosage par la LH. En effet, plus de 48% des patientes ayant subi un double suivi de leur cycle montraient un décalage de 24 (15,4%) à 48 (33,3%) heures de l'estimation de la date d'ovulation entre la TBC et le dosage par la LH, provoquant un décalage de l'estimation de la fenêtre d'implantation. Nos résultats confirment ceux rapportés par l'équipe de Morris *et al.*, (1976), démontrant un décalage de 0-24h et 48h chez 82% et 18% des patientes, respectivement dans une cohorte de 27 patientes avec des cycles menstruels réguliers. Le suivi de cycle par une courbe de la TBC, n'est donc pas un indicateur satisfaisant de l'ovulation. D'ailleurs, une équipe a comparé l'estimation de l'ovulation par la TBC et des tests d'ovulation avec une vérification échographique transvaginale de la rupture du follicule, une méthode considérée comme un indicateur fiable. Ils ont trouvé que pour 73% des patientes, la TBC concordait avec l'échographie contre 97% des patients pour celles suivies par le dosage de la LH (Guermandi *et al.*, 2001). Pour ces raisons, dans le cadre de la présente étude, les patientes ayant eu recours à un suivi uniquement par la TBC ont été exclues des analyses.

Par ailleurs, il faut noter que le pic de LH n'a pas pu être détecté chez certaines patientes par les tests d'ovulation, particulièrement les patientes avec un syndrome des ovaires polykystiques. Ainsi le prélèvement endométrial a dû être annulé chez ces patientes. A la suite de toutes ces contraintes, sur les 143 patientes initialement recrutées, 48 biopsies ont été prélevées pendant la fenêtre théorique d'implantation.

La période en phase mi-sécrétoire où l'endomètre acquiert un statut réceptif à l'embryon, appelée la fenêtre d'implantation, s'étend théoriquement sur 4 jours (Psychoyos, 1986). Sur un cycle menstruel typique de 28 jours, la fenêtre d'implantation débute normalement vers le 20^{ème} jour du cycle, ou vu autrement, 7 jours après la décharge de LH. Ainsi l'acquisition de la réceptivité endométriale se synchronise avec le développement embryonnaire. Actuellement l'assomption générale au sein des cliniques d'AMP voudrait que cette fenêtre d'implantation soit constante chez toutes les femmes. Cependant, il existe de plus en plus d'évidences que, chez certaines patientes, le moment de la fenêtre d'implantation est variable

d'une patiente à une autre, ainsi que la durée même de cette fenêtre, variant de quelques heures à 48 heures (Blesa *et al.*, 2014).

Dans le cadre de la présente étude, nos résultats démontrent l'hétérogénéité du moment de la fenêtre d'implantation. A LH+7, 56% des patientes démontraient un endomètre réceptif alors que cette proportion augmente à 79% à LH+8. Ces résultats mettent en évidence l'importance de déterminer le moment précis où l'endomètre de chaque patiente acquiert un statut réceptif. Bien que préliminaires, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'équipe du Pr. Samir Hamamah.

Le test ERA (Endometrial Receptivity Array) qui consiste à analyser, par la technologie de puce à ADN, l'expression de 238 gènes sur une biopsie de l'endomètre effectué pendant la fenêtre théorique d'implantation, a permis de mettre en évidence des conclusions similaires. Les auteurs suggèrent que les échecs d'implantations ne sont pas imputables à un défaut de l'endomètre, mais plutôt à une mauvaise synchronisation entre l'endomètre et l'embryon (Ruiz-Alonso *et al.*, 2013). En effet, parmi les patientes avec de multiples échecs d'implantation, le test diagnostique ERA a permis de démontrer un retard de la fenêtre d'implantation chez un quart de ces patientes (Ruiz-Alonso *et al.*, 2013).

Il est reconnu que les traitements de FIV/ICSI doivent être personnalisés pour chaque patiente. Par exemple, le type de protocole (antagoniste ou agoniste à la GnRH) est sélectionné selon la réserve ovarienne. Les doses de gonadotrophines sont ajustées selon la réserve et la réponse ovarienne. La technique d'insémination (FIV standard ou ICSI) est sélectionnée selon la mobilité et la concentration des spermatozoïdes. De plus, le nombre d'embryons transférés est décidé selon l'historique d'implantation de la patiente. Cependant, dans la pratique courante, l'évaluation du statut de l'endomètre pendant la fenêtre théorique d'implantation n'est appliquée que très rarement et cible préférentiellement les patientes avec un historique de multiples échecs d'implantation. L'identification de la fenêtre d'implantation pourrait permettre de cibler le meilleur moment pour le transfert embryonnaire et guider le clinicien dans la prise en charge de patientes, et ce, indépendamment de son historique d'infertilité. La nécessité d'effectuer des transferts personnalisés d'embryons en identifiant pour chaque patiente le moment du cycle où son endomètre est réceptif prend tout son sens de par l'hétérogénéité inter-patiente du moment de l'apparition de la fenêtre d'implantation. La stratégie de remplacement des embryons en fonction du résultat du Win-Test consiste à cibler une meilleure synchronisation du dialogue entre l'endomètre et l'embryon et ce, en déterminant le jour optimal de réceptivité endométriale. Dans le respect de cette synchronisation du dialogue, un blastocyste (J5) sera donc transféré lorsque l'endomètre sera dit réceptif, un embryon J2 ou J3

devra être replacé 72 et 48 heures avant, respectivement, offrant ainsi la possibilité à l'endomètre et l'embryon de finir leur maturation ensemble.

Dans le cadre de ce projet nous avons mis en place le Win-Test dans un autre centre d'AMP, la prochaine étape sera de faire de OVO un centre de référence pour le Win-Test permettant la distribution de ce dernier sur le continent américain. De plus, des études multicentriques avec un remplacement embryonnaire personnalisé en fonction du résultat du Win-Test sont actuellement en cours afin de juger de la pertinence de ce test.

Bibliographie

- Blesa, D. Ruiz-Alonso, M. Simón, C. (2014) 'Clinical management of endometrial receptivity' *Semin Reprod Med* 32(5) pp. 140-3.
- Guermandi, E. Vegetti, W. Bianchi, M. M. Uglietti, A. Ragni, G. Crosignani, P. (2001) 'Reliability of ovulation tests in infertile women' *Obstet Gynecol* 97(1) pp. 92-6.
- Haouzi, D. Bissonnette, L. Gala, A. Assou, S. Entezami, F. Perrochia, H. Dechaud, H. Hugues, JN. Hamamah, S. (2014) 'Endometrial receptivity profile in patients with premature progesterone elevation on the day of HCG administration' *Biomed Res Int*. 951937.
- Haouzi, D. Bissonnette, L. Letur, H. Entezami, F. Perrochia, H. Chahine, H. Olivennes, F. Hamamah, S. (2015) 'Endometrial receptivity under hormone replacement therapy in oocyte-donation recipient patients: transcriptomic approach' *In press*
- Martinez, AR. Voorhorst, FJ. Schoemaker, J. (1992) 'Reliability of urinary LH testing for planning of endometrial biopsies' *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 43(2) pp. 137-42.
- Morris, N. Underwood, L. Easterling, W. (1976) 'Temporal relationship between basal body temperature nadir and luteinizing hormone surge in normal women' *Fertil Steril* 27(7) pp. 780-3.
- Psychoyos, A. (1986) 'Uterine receptivity for nidation', *Annals of the New York Academy of Science*, 476: 36-46.
- Quagliarello, J. Arny, M. (1986) 'Inaccuracy of basal body temperature charts in predicting urinary luteinizing hormone surges' *Fertil Steril* 45(3) pp. 334-7.
- Ruiz-Alonso, M. Blesa, D. Díaz-Gimeno, P. Gómez, E. Fernández-Sánchez, M. Carranza, F. Carrera, J. Vilella, F. Pellicer, A. Simón, C. (2013) 'The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure' *Fertil Steril* 100(3) pp. 818-24.

Chapitre 4 Endometrial receptivity profile in patients with premature progesterone elevation on the day of HCG administration

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2014, Article ID 951937, 10 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/951937>



Research Article

Endometrial Receptivity Profile in Patients with Premature Progesterone Elevation on the Day of hCG Administration

Delphine Haouzi,^{1,2,3} Laurence Bissonnette,^{1,2,3,4} Anna Gala,⁵
Said Assou,^{1,2,3} Frida Entezami,⁶ Hélène Perrochia,⁷ Hervé Dechaud,^{1,2,3,5}
Jean-Noel Hugues,⁸ and Samir Hamamah^{1,2,3,5}

¹ CHU Montpellier, Institut de Recherche en Biothérapie, Hôpital Saint-Eloi, 34295 Montpellier, France

² INSERM U1040, Hôpital Saint-Eloi, 34295 Montpellier, France

³ Université Montpellier 1, UFR de Médecine, Equipe "Développement Embryonnaire Précoce et Cellules Souches Embryonnaires Humaines", 34000 Montpellier, France

⁴ OVO Fertility, 8000 Boulevard Decarie No. 100, Montréal, QC, Canada H4P 2S4

⁵ CHU Montpellier, ART/PGD Division, Département de Biologie de la Reproduction, Hôpital Arnaud de Villeneuve, 34295 Montpellier, France

⁶ Laboratoire Dynabio, Polyclinique du Cotentin, 50120 Equeurdreville, France

⁷ CHU Montpellier, Hôpital Gui de Chauliac, Service Anatomie Cytologie Pathologiques, 34295 Montpellier, France

⁸ CHU Léonard de Vinci-Université Paris XIII, Service de Médecine de la Reproduction, Hôpital Jean Verdier, 93143 Bondy, France

Correspondence should be addressed to Samir Hamamah; s-hamamah@chu-montpellier.fr

Received 16 December 2013; Revised 3 April 2014; Accepted 3 April 2014; Published 28 April 2014

Academic Editor: Javeed Iqbal

Copyright © 2014 Delphine Haouzi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The impact of a premature elevation of serum progesterone level, the day of hCG administration in patients under controlled ovarian stimulation during IVF procedure, on human endometrial receptivity is still debated. In the present study, we investigated the endometrial gene expression profile shifts during the prereceptive and receptive secretory stage in patients with normal and elevated serum progesterone level on the day of hCG administration in fifteen patients under stimulated cycles. Then, specific biomarkers of endometrial receptivity in these two groups of patients were tested. Endometrial biopsies were performed on oocyte retrieval day and on day 3 of embryo transfer, respectively, for each patient. Samples were analysed using DNA microarrays and qRT-PCR. The endometrial gene expression shift from the prereceptive to the receptive stage was altered in patients with high serum progesterone level (>1.5 ng/mL) on hCG day, suggesting accelerated endometrial maturation during the periovulation period. This was confirmed by the functional annotation of the differentially expressed genes as it showed downregulation of cell cycle-related genes. Conversely, the profile of endometrial receptivity was comparable in both groups. Premature progesterone rise alters the endometrial gene expression shift between the prereceptive and the receptive stage but does not affect endometrial receptivity.

1. Introduction

The impact of premature serum progesterone elevation at the end of the follicular phase under controlled ovarian stimulation (COS) cycle for *in vitro* fertilization (IVF) is still debated. While several studies reported lower pregnancy rates in patients with high progesterone concentration on the day of human chorionic gonadotropin (hCG) administration [1–9], one found a favourable effect on pregnancy outcome

[10] and others failed to demonstrate any association [11–21]. Although the mechanism by which premature serum progesterone elevation might alter the embryo transfer outcome is still unclear, there are accumulated data suggesting a negative impact on endometrium [22, 23]. Elevated progesterone levels might induce premature endometrial maturation and, as a consequence, earlier opening of the implantation window that leads to asynchronization of the crosstalk between embryo and endometrium. Accelerated endometrial

maturation following COS has been clearly demonstrated by histological dating on the day of oocyte retrieval [24–27], but this is not the case during the implantation window [22]. Therefore, to what extent endometrial receptivity is impaired in patients with high serum progesterone level is questionable.

In addition, very few studies have assessed the impact of serum progesterone elevation on the endometrial gene expression profile during the implantation window [22, 23] (Table 1). By comparing the endometrial gene expression profiles during the implantation window in patients with high and normal serum progesterone level on the day of hCG administration, these authors found significant differences in the expression of genes that play a crucial role in endometrial function. Although some of these genes were related to endometrial receptivity, no clear assessment of the endometrial status during the implantation window in the patients with high serum progesterone level on hCG day was carried out.

The aim of the study was (i) to compare individually the endometrial gene expression shift between the prereceptive and receptive secretory stages in patients with normal (<1.5 ng/mL) and high (>1.5 ng/mL) serum progesterone levels on the day of hCG administration and, then, (ii) to test biomarkers of endometrial receptivity in these two groups of patients.

2. Materials and Methods

2.1. Patients' Characteristics and Endometrial Biopsies. The study population included 15 patients (age 31 years $\pm$ 3) who were referred for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for male infertility and were recruited after written informed consent. This project was approved by the Ethical Committee of the Institut de Recherche en Biothérapie. All patients had normal serum FSH, LH, and estradiol on day 3 of COS under either GnRH agonist long or antagonist protocols, as well as on the day of hCG administration (Table 2). An endometrial biopsy was obtained on the day of oocyte collection (hCG+2) and another one during embryo transfer (hCG+5), respectively. Endometrial biopsies ($n = 30$) were washed and frozen individually at -80°C prior to total RNA extraction with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

2.2. Progesterone Measurement. Serum progesterone was measured on the day of hCG administration by using an automated Cobas e411 instrument (Roche Diagnostics). Intra-assays and interassay coefficients of variation (CV) were <2.7% and <9.1%, respectively.

2.3. Microarray Hybridization. Total RNA (100 ng) was used to prepare twice amplified and labelled cRNA for hybridization with HG-U133 plus 2.0 arrays (Affymetrix, UK) as described in [29]. Each endometrial sample was processed individually on a separate DNA microarray chip.

2.4. Data Processing and Microarray Data Analysis. Scanned GeneChip images were processed using the Affymetrix GCOS 1.4 software to obtain the intensity value signal

and the absent/present detection call for each probe set using the default analysis settings and global scaling as first normalization method. Probe intensities were derived using the MAS5.0 algorithm.

Patients ($n = 15$) were divided into two groups according to their serum progesterone concentration ([P]) on the day of hCG administration: <1.5 ng/mL (normal [P] group, $n = 7$ patients) and >1.5 ng/mL (high [P] group, $n = 8$ patients) (Table 2). The number of patients under GnRH long agonist protocol was similar in each group (2 per group). To compare the endometrial gene expression profile shift between hCG+2 and hCG+5 samples in the two groups of patients, a probe set selection using the detection call (present in all samples of the selected group) and a coefficient of variation $\geq 40\%$ between endometrial samples were first carried out. Then, the significant analysis of microarrays (SAM; Stanford University) [30] was used to identify genes that were significantly differentially expressed between the hCG+2 and hCG+5 endometrium samples (paired-sample analysis) from the normal and high [P] groups. The lists of identified genes (fold change, $\text{FC} > 2$; false discovery rate, $\text{FDR} < 5\%$) were submitted to Ingenuity (<http://www.ingenuity.com>) to identify the biological pathways/functions that were specific of the high serum [P] group. Unsupervised hierarchical clustering analyses were performed with the Cluster and TreeView software packages.

2.5. Quantitative RT-PCR Analyses. To assess biomarkers of endometrial receptivity, RNA (0.5 μg) of receptive endometrium samples from patients with normal (hCG+5, $n = 3$) and high [P] (hCG+5, $n = 3$) on the day of hCG administration was used for reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). To validate some microarray data comparing the endometrial gene expression shift between prereceptive and receptive secretory stages, RNA (0.5 μg) of prereceptive samples from patients with normal (hCG+2, $n = 3$) and high [P] (hCG+2, $n = 3$) was also used. For qPCR, 2 μL (of a 1:5 dilution) of the first strand DNA was added to a 10 μL reaction mixture containing 0.25 μM of each primer and 5 μL of 2X LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche, Mannheim, Germany). DNA was amplified during 45 cycles with annealing temperature at 63°C using the LightCycler 480 detection system (Roche). The sample values were normalized to *PGK1* (phosphoglycerate kinase 1) expression using the following formula: $E_{\text{tested primer}}^{\Delta\text{Ct}}/E_{\text{PGK1}}^{\Delta\text{Ct}}$ ($E = 10^{-1/\text{slope}}$), $\Delta\text{Ct} = \text{Ct control} - \text{Ct unknown}$, where E corresponds to the efficiency of the PCR reaction. The E value was obtained by a standard curve that varies in function of the primers used. One receptive endometrium sample from a patient with normal serum [P] was used as control. Each sample was analysed in duplicate and multiple water blanks were included.

2.6. Statistical Analyses. Statistical analyses of the clinical and qRT-PCR data were performed using the GraphPad InStat

TABLE 1: Design of three microarray-based studies that investigated the impact of high serum progesterone level on the endometrial gene expression profile.

Study	Study population	Number of patients	Number of samples	Sampling time	[P] cutt-off (ng/mL)	Compared samples	Fold change	Number of genes Up	Number of genes Down
[22]	Oocyte donors	12	12	hCG+7	1.5	hCG+7, [P] > 1.5 versus hCG+7, [P] < 1.5 (n = 6)	≥2	64	76
[23]	Patients undergoing IVF due to tubal or male infertility	10	10	hCG+8	1.2, 1.9	hCG+8, [P] < 1.2 versus hCG+8, [P] > 1.9 (n = 5)	≥2	13	9
[27]	Not specified	14	14	hCG+2	1, 1.5	hCG+2, [P] ≤ 0.9 versus hCG+2, 1 > [P] > 1.5 (n = 3) (n = 6) hCG+2, 1 > [P] > 1.5 versus hCG+2, [P] > 1.5 (n = 6)	≥1.4	5*	23*
This study for ICSI	Normoovulatory women referred for ICSI	15	30	hCG+2, hCG+5	1.5	hCG+2 [P] < 1.5 versus hCG+5 [P] < 1.5 (n = 7)	>2	877	600
						hCG+2 [P] > 1.5 versus hCG+5 [P] > 1.5 (n = 8)		123	110

*Data are expressed in number of probe sets; n: number of samples; ICSI: intracytoplasmic sperm injection.

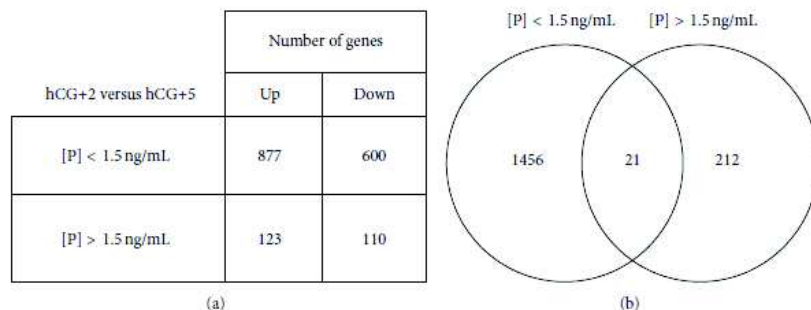


FIGURE 1: (a) Number of genes that were up- or downregulated in the normal and high [P] groups. (b) Venn diagram of the transcripts that were differentially expressed in the prereceptive and the receptive endometrial samples from patients with normal or high serum [P].

TABLE 2: Patients' clinical characteristics on the day of hCG administration and pregnancy outcome.

	[P] <1.5 ng/mL (n = 7)	[P] >1.5 ng/mL (n = 8)	P value
Age (years)	31 ± 4.9	30.1 ± 2.7	NS
[P] (ng/mL)	0.95 ± 0.24	2.6 ± 0.91	<0.001
E2 (pg/mL)	2509 ± 1357	2682 ± 2098	NS
LH (mIU/mL)	1.19 ± 0.19	1.25 ± 0.96	NS
Total FSH dose (IU)	1830 ± 414	1962 ± 262	NS
Number of retrieved oocytes	11.6 ± 5.2	15.5 ± 7.6	NS
Pregnancy (%) [*]	28.6	12.5	NS

Data are the mean ± SEM. NS: nonsignificant. ^{*} According to the serum β -human chorionic gonadotrophin measured 16 days after embryo transfer.

3 software. Differences between groups were considered significant when Student's *t*-test gave a *P* value < 0.05.

3. Results

3.1. COS Parameters and Embryo Transfer Outcome. COS parameters and embryo transfer outcome were not significantly different between groups but for the serum [P] on the day of hCG administration (Table 2).

3.2. Gene Expression Profile Shifts between the Prereceptive and Receptive Secretory Stage in the Normal and High Serum [P] Groups. Using the detection call and the variation coefficient for a first selection of genes expressed in the hCG+2 and hCG+5 endometrium samples, 6084 and 6130 genes were identified in the normal and high [P] groups, respectively. Then, SAM analysis of these microarray data identified 1477 and 233 genes that were differentially modulated between the two endometrial stages in the normal and high [P] group, respectively. The proportion of upregulated (59% in the normal serum group and 53% in the high serum [P] group) and downregulated genes (41% in the normal serum group and 47% in the high serum [P] group) was similar in the two groups of patients (Figure 1(a)). However, the fold changes were more important in the normal group [P] ($-48.9 \leq$ fold change ≤ 79.9) than in the high [P] group ($-5.9 \leq$ fold change ≤ 40.4).

3.3. Cell Cycle-Related Genes Are Downregulated in the High Serum [P] Group. To identify endometrial genes that were specifically modulated in the high serum [P] group between the prereceptive (hCG+2) and receptive (hCG+5) stage, we crossintersected the lists of genes that were differentially expressed between the two stages in the endometrium samples from the high ($n = 233$ genes) and normal ($n = 1477$ genes) [P] groups (Figure 1(b)). We identified 212 genes that were exclusively modulated in the high [P] group. Among them, more than 50 genes were involved in the cell cycle [*P* value = $2.22 E -11 - 2.41 E -02$], including several members of the cell division cycle family (*CDC20*, *CDC25C*, *CDCA1*, *CDCA2*, *CDCA5*, *CDCA8*), cyclins (*CCNB1*, *CCNB2*), and kinesins (*KIF4A*, *KIF11*, *KIF15*, *KIF23*) (Figure 2 and Table S1 for the complete list) (see Table S1 in the Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2014/951937>); 75% of these genes were downregulated. Some of these genes (*CDCA2*, *CDCA8*, *FOXO1*, and *TGFB2*) have been validated by qRT-PCR (Figure 3). In addition, we identified 21 genes that were common to both groups (Table 3).

3.4. Endometrial Receptivity in Patients with High Serum Progesterone Level. To assess whether endometrial receptivity was affected in the high serum [P] group, we used the endometrial receptivity predictor list (54 genes) that we previously described [28] for unsupervised clustering of the

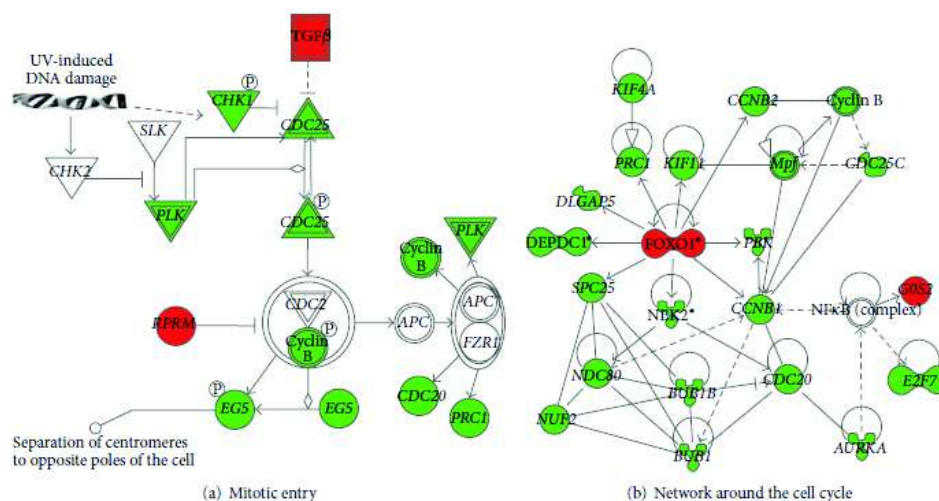


FIGURE 2: Signalling pathways that were altered in the high serum [P] group. The Ingenuity Pathway software was used to identify the functional pathways associated with genes that were differentially expressed between the prereceptive and receptive endometrial stages in the high [P] group. The majority of genes related to mitotic entry (a) and cell cycle (b) were downregulated. In this network, edge types are indicative: a plain line indicates direct interactions, a dashed line indicates indirect interactions, a line without arrowhead indicates binding only, a line finishing with a vertical line indicates inhibition, and a line with an arrowhead indicates "acts on". Green, downregulated; red, upregulated.

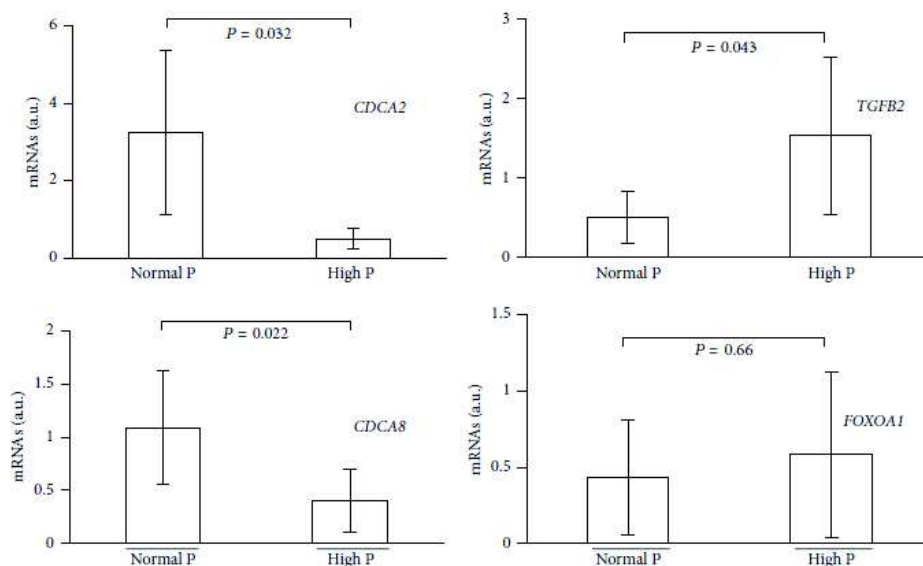


FIGURE 3: Validation by quantitative RT-PCR analysis of genes related to the cell cycle function modulated in the high [P] group. RNA isolated from hCG+2 and hCG+5 endometrial samples of normal and high serum [P] patients ($n = 3$ /each group) was used. Data are the mean $\pm$ SEM. NS, nonsignificant.

TABLE 3: List of genes shared by the normal serum [P] and high serum [P] groups.

Gene symbol	[P] <1.5 ng/mL		[P] >1.5 ng/mL	
	Fold change	FDR (%)	Fold change	FDR (%)
ATOH8	6.74	0.41	2.65	3.20
DLGAP1	2.15	0.98	3.08	4.98
GGT1	3.23	4.93	2.82	3.20
MAOA	3.41	1.48	3.23	4.98
ITGB4	3.82	0.15	2.86	3.20
MTIH	4.57	0.41	12.97	1.75
EDD1	-2.31	0.17	-2.05	0.00
INDO	-2.71	0.00	4.02	0.00
KIAA0703	-2.75	0.00	2.75	1.75
RGS16	-4.53	0.00	2.36	4.36
RGS4	-3.70	0.00	2.10	4.36
TACC2	-2.43	0.11	2.22	3.74
TNFAIP3	-2.04	0.00	2.51	3.20
MPHOSPH1	2.06	0.61	-2.09	2.91
ARHGAP26	3.00	1.74	-2.01	2.09
CCNA2	2.13	3.68	-2.09	2.91
CDC2	2.59	1.74	-2.15	2.91
DNAJC9	8.41	0.98	-2.07	0.00
FGF13	2.35	0.26	-2.18	0.00
FNI	2.33	0.15	-2.01	3.30
GPR64	2.53	1.48	-3.20	2.09

endometrial gene expression profiles at hCG+2 (prereceptive) and hCG+5 (receptive stage). A clear segregation of the hCG+2 and hCG+5 endometrium samples independently of serum [P] was observed, suggesting a similar transcriptomic shift of endometrial receptivity biomarkers in the two groups (Figure 4).

The most overexpressed predictors ($n = 13$) of the endometrial receptivity were selected for validation by qRT-PCR. No significant difference in the two groups of patients (normal versus high [P]) was observed, except for *CD68* and *KRT80* (Figure 5).

4. Discussion

Our data indicate that premature progesterone elevation alters the endometrial gene expression shift from the pre-receptive to the receptive stage. Indeed, the transcriptomic endometrial gene expression shift in the normal serum [P] group was comparable to the one previously described for patients in COS protocols [29]. In the high serum [P] group, this transcriptomic shift was reduced with only 233 genes differentially expressed between hCG+2 and hCG+5. This finding suggests that in the high [P] group endometrial maturation is accelerated during the early secretory phase. This hypothesis was confirmed by the functional annotation analysis as it revealed that many of the downregulated genes are involved in cell cycle functions. Previous studies [24, 27] also showed an advanced endometrial maturation (2 to 4 days) based on histological dating on the day of oocyte retrieval

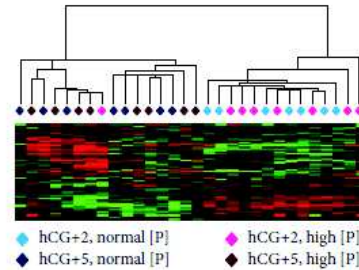


FIGURE 4: Unsupervised hierarchical clustering of the prereceptive and receptive endometrium samples using the previously described [28] predictor list. Comparison of the gene expression profiles at hCG+2 and hCG+5 in the normal and high serum [P] groups revealed similar transcriptomic profiles. Green, downregulated; red, upregulated.

(hCG+2). However, this was irrespective of the serum [P] on the day of hCG administration. Furthermore, it is well known that progesterone might inhibit the normal endometrial proliferation [31]. More precisely, influence of progesterone on cell proliferation appears dose dependent. Consequently, this can explain the downregulation of genes related to the cell cycle functions in patients with high serum [P]. This finding was in conjunction with functional annotations reported by Labarta et al. [22] revealing alteration of the cellular growth and proliferation in patients with high serum progesterone level under COS. Simultaneous to its critical role in the control of the proliferation status, progesterone is necessary to the acquisition of the decidualization morphotype, a key event for acquisition of the receptive endometrial status and, therefore, successful implantation.

However, alteration of the endometrial transcriptome shift in patients with high serum [P] did not seem to affect endometrial receptivity. Indeed, we observe by quantitative RT-PCR analysis that most endometrial receptivity biomarkers (genes that are upregulated during the implantation window) display similar or higher expression levels in patients with high [P] in comparison to women with normal serum [P]. These biomarkers were selected based on our previous study that identified new biomarkers of human endometrial receptivity by comparing the endometrial gene expression profile shift during the prereceptive and receptive secretory stages in the same patients during a natural cycle [28]. Two of them (*IL15* and *SPPI*) were identified by all six transcriptomic studies that compared the same endometrial samples from women in natural cycles [32].

Labarta et al. [22] examined 25 windows of implantation genes that are strongly related to endometrium receptiveness and embryo implantation and were previously described in [33]. However, only 8 of these genes were referred in their genomic diagnostic tool as specific to endometrial receptivity [34]. Based on the expression of these eight biomarkers, they concluded that endometrial receptivity was affected in patients with high serum [P] [22]. However, by thoroughly analysing their data, we think that the expression of these

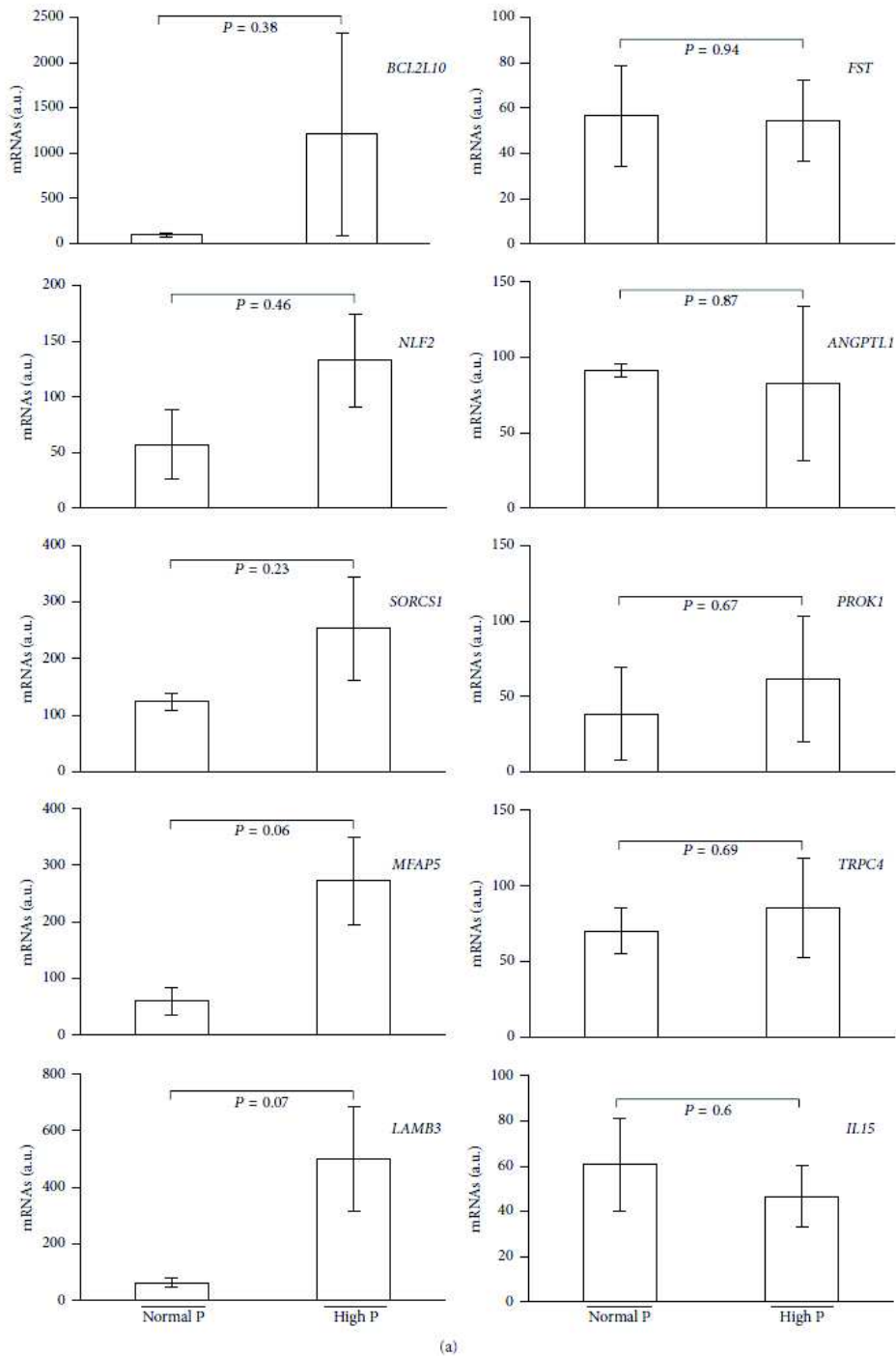


FIGURE 5: Continued.

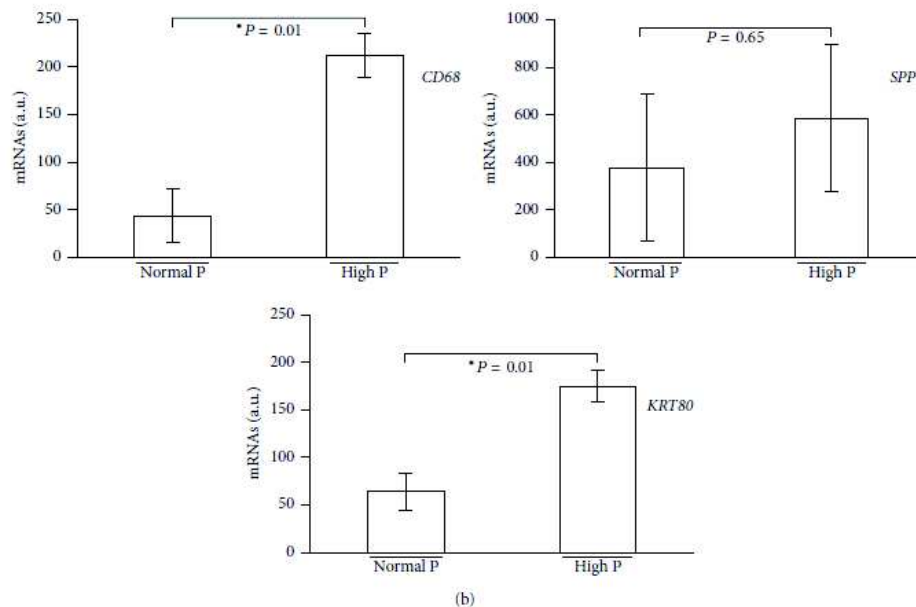


FIGURE 5: Validation by quantitative RT-PCR analysis of several biomarkers of endometrial receptivity using RNA isolated from hCG+5 endometrial samples of normal and high serum [P] patients ($n = 3$ /each group). Data are the mean $\pm$ SEM. * P value < 0.05 ; NS, nonsignificant.

eight biomarkers was increased in both fertile women with natural cycles and in patients with high serum [P], albeit to a lesser extent, thus strongly suggesting that endometrial receptivity was not affected in patients with high serum [P]. In addition, using the approach described by Labarta et al. [22], we found no significant differences in the gene expression profiles of receptive endometrium samples from patients with high or normal serum [P], whatever the [P] threshold on the day of hCG administration (data not shown), thus strongly suggesting again that endometrial receptivity is similar in patients with normal and high [P].

Therefore, our findings point to an abnormally accelerated endometrial maturation but only during the prereceptive secretory phase and not during the implantation window. Consequently, transfer of a day-3 embryo in such too precociously mature endometrium would not allow the proper establishment of the embryo-endometrium crosstalk; this might explain why the pregnancy outcome was impaired when embryo transfer was performed on day 3 (hCG+5) in patients with high serum [P] on the day of hCG administration [35]. On the other hand, when embryo transfer was performed on day 5 (hCG+7), no detrimental effect on the pregnancy outcome was observed [35, 36], particularly in patients in GnRH antagonist protocols [36]. Another study reported increased cumulative pregnancy rates in patients with high serum [P] in GnRH antagonist protocols following fresh or frozen-thawed embryo transfer [37]. All these findings suggest that (i) the periovulatory endometrial

maturation advancement does not necessarily lead to a deficit of endometrial receptivity and (ii) the endometrium can recover from exposure to supraphysiologic steroid concentrations [35]. Moreover, as described in Labarta et al. [22], histological dating (Noyes' criteria, [38]) revealed the absence of endometrial maturation advancement during the implantation window (hCG+7) in patients under COS protocols, regardless of the used GnRH analogues and the serum [P] on the day of hCG administration. In addition, premature elevation of serum [P] on the day of hCG administration during COS did not impact the pregnancy rate in oocyte donation programmes, suggesting a nondeleterious effect of premature [P] rise on endometrial receptivity [39, 40].

The mechanisms explaining serum [P] elevation at the time of hCG administration remain unclear. However, there are accumulating data suggesting that the main factors associated with increased risk of progesterone rise during COS cycles are ovarian parameters, including the total FSH dose, the intensity of the ovarian response, and excess number of follicles or oocytes [41]. Such parameters were not significantly different in our two groups of patients probably due to the small patients' number (Table 1). In addition, the deleterious effect of premature progesterone rise is probably not due to an impact on endometrial receptivity or ovarian parameters but rather to a desynchronized dialogue between embryo and endometrium. This hypothesis should be confirmed.

In conclusion, the gene expression profiles of the endometrial shift from the prereceptive to the receptive secretory stage are altered in patients with high serum [P] on the day of hCG administration in comparison to patients with normal [P]. This alteration suggests an acceleration of endometrial maturation during the periovulatory phase that should desynchronize the embryo-endometrium dialogue. On the other hand, endometrial advancement seems to decrease during the perireceptive phase and it does not affect endometrial receptivity.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors thank the direction of the University Hospital of Montpellier and Institute for Research in Biotherapy (IRB) for support and the ART team for their assistance during this study. 85% of the specific genes in Figure 4 form part of protected information under Patent Application no. PCT/EP2011/058757.

References

- [1] W. Schoolcraft, E. Sinton, T. Schlenker, D. Huynh, F. Hamilton, and D. R. Meldrum, "Lower pregnancy rate with premature luteinization during pituitary suppression with leuprolide acetate," *Fertility and Sterility*, vol. 55, no. 3, pp. 563–566, 1991.
- [2] K. M. Silverberg, W. N. Burns, D. L. Olive, R. M. Riehl, and R. S. Schenken, "Serum progesterone levels predict success of in vitro fertilization/embryo transfer in patients stimulated with leuprolide acetate and human menopausal gonadotropins," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 73, no. 4, pp. 797–803, 1991.
- [3] Y. Mio, A. Sekijima, T. Iwabe, Y. Onohara, T. Harada, and N. Terakawa, "Subtle rise in serum progesterone during the follicular phase as a predictor of the outcome of in vitro fertilization," *Fertility and Sterility*, vol. 58, no. 1, pp. 159–166, 1992.
- [4] A. Shulman, Y. Ghetler, Y. Beyth, and I. Ben-Nun, "The significance of an early (premature) rise of plasma progesterone in in vitro fertilization cycles induced by a "long protocol" of gonadotropin releasing hormone analogue and human menopausal gonadotropins," *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 13, no. 3, pp. 207–211, 1996.
- [5] E. Bosch, I. Valencia, E. Escudero et al., "Premature luteinization during gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles and its relationship with in vitro fertilization outcome," *Fertility and Sterility*, vol. 80, no. 6, pp. 1444–1449, 2003.
- [6] E. Bosch, E. Labarta, J. Crespo et al., "Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: analysis of over 4000 cycles," *Human Reproduction*, vol. 25, no. 8, pp. 2092–2100, 2010.
- [7] A. N. Andersen, P. Devroey, and J.-C. Arce, "Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial," *Human Reproduction*, vol. 21, no. 12, pp. 3217–3227, 2006.
- [8] B. Xu, Z. Li, H. Zhang et al., "Serum progesterone level effects on the outcome of in vitro fertilization in patients with different ovarian response: an analysis of more than 10,000 cycles," *Fertility and Sterility*, vol. 97, pp. 1321–1327.e4, 2012.
- [9] E. M. Kolibianakis, C. A. Venetis, J. Bontis, and B. C. Tarlatzis, "Significantly lower pregnancy rates in the presence of progesterone elevation in patients treated with GnRH antagonists and gonadotropins: a systematic review and meta-analysis," *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 13, no. 3, pp. 464–470, 2012.
- [10] N. Doldi, E. Marsiglio, A. Destefani, A. Gessi, G. Merati, and A. Ferrari, "Elevated serum progesterone on the day of HCG administration in IVF is associated with a higher pregnancy rate in polycystic ovary syndrome," *Human Reproduction*, vol. 14, no. 3, pp. 601–605, 1999.
- [11] M. C. Edelstein, H. J. Seltman, B. J. Cox, S. M. Robinson, R. A. Shaw, and S. J. Muasher, "Progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin administration in cycles with gonadotropin-releasing hormone agonist suppression are not predictive of pregnancy outcome," *Fertility and Sterility*, vol. 54, no. 5, pp. 853–857, 1990.
- [12] C. R. Givens, E. D. Schriock, P. V. Dandekar, and M. C. Martin, "Elevated serum progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin administration do not predict outcome in assisted reproduction cycles," *Fertility and Sterility*, vol. 62, no. 5, pp. 1011–1017, 1994.
- [13] M. Bustillo, J. J. Stern, and C. B. Coulam, "Serum progesterone at the time of human chorionic gonadotropin does not predict pregnancy in in-vitro fertilization and embryo transfer," *Human Reproduction*, vol. 10, no. 11, pp. 2862–2867, 1995.
- [14] M. I. Abuzeid and M. A. Sasy, "Elevated progesterone levels in the late follicular phase do not predict success of in vitro fertilization-embryo transfer," *Fertility and Sterility*, vol. 65, no. 5, pp. 981–985, 1996.
- [15] G. E. Hofmann, J. Khoury, C. A. Johnson, J. Thie, and J. Scott R.T., "Premature luteinization during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization-embryo transfer has no impact on pregnancy outcome," *Fertility and Sterility*, vol. 66, no. 6, pp. 980–986, 1996.
- [16] F. Ubaldi, C. Albano, M. Peukert et al., "Subtle progesterone rise after the administration of the gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix in intracytoplasmic sperm injection cycles," *Human Reproduction*, vol. 11, no. 7, pp. 1405–1407, 1996.
- [17] D. V. Moffitt, J. T. Queenan Jr., B. S. Ruth Shaw, and S. J. Muasher, "Progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin do not predict pregnancy outcome from the transfer of fresh or cryopreserved embryos from the same cohort," *Fertility and Sterility*, vol. 67, no. 2, pp. 296–301, 1997.
- [18] B. Urman, C. Alatas, S. Aksoy, R. Mercan, A. Isiklar, and B. Balaban, "Elevated serum progesterone level on the day of human chorionic gonadotropin administration does not adversely affect implantation rates after intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer," *Fertility and Sterility*, vol. 72, no. 6, pp. 975–979, 1999.
- [19] F. Martínez, B. Coroleu, E. Clua et al., "Serum progesterone concentrations on the day of HCG administration cannot predict pregnancy in assisted reproduction cycles," *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 8, no. 2, pp. 183–190, 2004.
- [20] C. A. Venetis, E. M. Kolibianakis, E. Papanikolaou, J. Bontis, P. Devroey, and B. C. Tarlatzis, "Is progesterone elevation on the

- day of human chorionic gonadotrophin administration associated with the probability of pregnancy in in vitro fertilization? A systematic review and meta-analysis," *Human Reproduction Update*, vol. 13, no. 4, pp. 343–355, 2007.
- [21] H. A. Saleh, M. S. E.-A. Omran, and M. Draz, "Does subtle progesterone rise on the day of HCG affect pregnancy rate in long agonist ICSI cycles?" *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 26, no. 5, pp. 239–242, 2009.
- [22] E. Labarta, J. A. Martínez-Conejero, P. Alamá et al., "Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis," *Human Reproduction*, vol. 26, no. 7, pp. 1813–1825, 2011.
- [23] R. Li, J. Qiao, L. Wang et al., "MicroRNA array and microarray evaluation of endometrial receptivity in patients with high serum progesterone levels on the day of hCG administration," *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 9, article 29, 2011.
- [24] E. Kolibianakis, C. Bourgain, C. Albano et al., "Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up," *Fertility and Sterility*, vol. 78, no. 5, pp. 1025–1029, 2002.
- [25] C. Simon, J. Oberyé, J. Bellver et al., "Similar endometrial development in oocyte donors treated with either high- or standard-dose GnRH antagonist compared to treatment with a GnRH agonist or in natural cycles," *Human Reproduction*, vol. 20, no. 12, pp. 3318–3327, 2005.
- [26] I. Van Vaerenbergh, L. Van Lommel, V. Ghislain et al., "In GnRH antagonist/rec-FSH stimulated cycles, advanced endometrial maturation on the day of oocyte retrieval correlates with altered gene expression," *Human Reproduction*, vol. 24, no. 5, pp. 1085–1091, 2009.
- [27] I. Van Vaerenbergh, H. M. Fatemi, C. Blockeel et al., "Progesterone rise on HCG day in GnRH antagonist/rFSH stimulated cycles affects endometrial gene expression," *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 22, no. 3, pp. 263–271, 2011.
- [28] D. Haouzi, K. Mahmoud, M. Fourar et al., "Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle," *Human Reproduction*, vol. 24, no. 1, pp. 198–205, 2009.
- [29] D. Haouzi, S. Assou, K. Mahmoud et al., "Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients," *Human Reproduction*, vol. 24, no. 6, pp. 1436–1445, 2009.
- [30] V. G. Tusher, R. Tibshirani, and G. Chu, "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 9, pp. 5116–5121, 2001.
- [31] C.-C. Chang, Y.-Y. Hsieh, K.-H. Hsu, and C.-S. Lin, "Effects of α and β recombinant FSH (Gonal-F, Puregon) and progesterone upon human endometrial cell proliferation in-vitro: a preliminary study," *Gynecological Endocrinology*, vol. 27, no. 2, pp. 110–116, 2011.
- [32] D. Haouzi, H. Dechaud, S. Assou, J. De Vos, and S. Hamamah, "Insights into human endometrial receptivity from transcriptomic and proteomic data," *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 24, no. 1, pp. 23–34, 2012.
- [33] J. A. Horcajadas, A. Pellicer, and C. Simón, "Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities," *Human Reproduction Update*, vol. 13, no. 1, pp. 77–86, 2007.
- [34] P. Díaz-Gimeno, J. A. Horcajadas, J. A. Martínez-Conejero et al., "A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature," *Fertility and Sterility*, vol. 95, no. 1, pp. 50–60.e15, 2011.
- [35] E. G. Papanikolaou, E. M. Kolibianakis, C. Pozzobon et al., "Progesterone rise on the day of human chorionic gonadotropin administration impairs pregnancy outcome in day 3 single-embryo transfer, while has no effect on day 5 single blastocyst transfer," *Fertility and Sterility*, vol. 91, no. 3, pp. 949–952, 2009.
- [36] R. Ochsenkühn, A. Arzberger, V. von Schonfeldt et al., "Subtle progesterone rise on the day of human chorionic gonadotropin administration is associated with lower live birth rates in women undergoing assisted reproductive technology: a retrospective study with 2,555 fresh embryo transfers," *Fertility and Sterility*, vol. 98, pp. 347–354, 2012.
- [37] H. M. Fatemi, K. Doody, G. Griesinger, H. Witjes, and B. Mannaerts, "High ovarian response does not jeopardize ongoing pregnancy rates and increases cumulative pregnancy rates in a GnRH-antagonist protocol," *Human Reproduction*, vol. 28, no. 2, pp. 442–452, 2012.
- [38] R. W. Noyes, A. T. Hertig, and J. Rock, "Dating the endometrial biopsy," *Fertility and Sterility*, vol. 1, pp. 3–25, 2012.
- [39] R. S. Legro, B. A. Ary, R. J. Paulson, F. Z. Stanczyk, and M. V. Sauer, "Premature luteinization as detected by elevated serum progesterone is associated with a higher pregnancy rate in donor oocyte in-vitro fertilization," *Human Reproduction*, vol. 8, no. 9, pp. 1506–1511, 1993.
- [40] M. A. B. Melo, M. Meseguer, N. Garrido, E. Bosch, A. Pellicer, and J. Remohí, "The significance of premature luteinization in an oocyte-donation programme," *Human Reproduction*, vol. 21, no. 6, pp. 1503–1507, 2006.
- [41] J. N. Hugues, "Impact of 'LH activity' supplementation on serum progesterone levels during controlled ovarian stimulation: a systematic review," *Human Reproduction*, vol. 27, no. 1, pp. 232–243, 2012.

Chapitre 5 Endometrial receptivity under hormone replacement therapy in oocyte-donation recipient patients: transcriptomic approach

D. Haouzi^{a,b,c}, L. Bissonnette^{a,b,c,d}, H. Letur^e, F. Entezami^g, H. Perrochia^h, H. Chahine^g, F. Olivennes^g, S. Hamamah^{a,b,c,f,i}.

^aCHU Montpellier, Institut de Médecine Régénératrice et de Biothérapie, Hôpital Saint-Eloi, Montpellier, 34295 France; ^bINSERM U1203 'Développement embryonnaire précoce humain et pluripotence', Hôpital Saint-Eloi, Montpellier, 34295 France; ^cUniversité Montpellier1, UFR de Médecine;; ^dOVO Fertility, 8000 Boulevard Decarie #100, Montréal, Québec, Canada H4P 2S4; ^eCentre de fertilité de l'Institut Mutualiste Montsouris, Paris; ^fCHU Montpellier, ART/PGD Division, Département de Biologie de la Reproduction, Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, F-34295 France ; ^gLaboratoire d'Eylau-Unilabs, Clinique de la Muette, Paris, 75116 France ; ^hCHU Montpellier, Hôpital Gui de Chauliac, Service Anatomie cytologie pathologiques, Montpellier, F-34295 France.

Running title: Endometrial receptivity under HRT for oocyte donation

ⁱ **corresponding author** : Pr. Samir Hamamah, ART/PGD Department, Arnaud de Villeneuve hospital, 34295 Montpellier, France. Phone: +33 (0)4 67 33 64 04, Fax: +33 (0)4 67 33 62 90, e-mail: s-hamamah@chu-montpellier.fr

Study funding/competing interests: This work was partially supported by a Grant for Fertility Innovation (GFI) from MerckSerono. The authors of the study have no competing interests to report.

E-mail addresses of each author: delphine.haouzi@inserm.fr, laurence.bissonnette@inserm.fr, helene.letur@imm.fr, entezami@gmx.net, h-perrochia@chu-montpellier.fr, professeurolivennes@live.fr, hikmat.chahine@unilabs.com, s-hamamah@chu-montpellier.fr

2015, Medical Research Archives (in press)

Abstract

Purpose: Few studies have investigated the endometrial receptivity status of oocyte-donation (OD) recipient patients at the specific hormone replacement therapy (HRT)-cycle timing (5 to 6 days after progesterone administration) where embryos at blastocyst stage were mostly replaced. The aim of our study was to analyse, during the implantation window, (i) the global endometrial gene expression profile, and (ii) the endometrial receptivity exploration by the Win-Test® in OD recipient patients under HRT compared to spontaneous cycle in patients awaiting for IVF.

Material and methods: This study included OD recipient patients without (n=7) or with (OD RIF, n=20) repeated implantation failures and 12 normal responder patients in spontaneous cycles used as control. Endometrial biopsies were performed during the peri-implantation phase. Samples were analysed using DNA microarrays and the endometrial gene expression profiles of HRT-treated OD recipient patients and of patients in spontaneous cycles were compared. Then, specific biomarkers of endometrial receptivity were assessed in the two groups of HRT-treated OD patients in comparison to control patients

Results: The global gene expression profile of peri-implantation endometrial samples from HRT-treated OD recipients and from patients in spontaneous cycles was different with significant alterations in the oestrogen receptor signalling [*GTF2H2B*, *POLR2B*, *POLR2E*], VEGF family ligand-receptor interactions [*VEGFR1*, *VEGFB*] and integrin signalling [*ITGAL*, *PAK7*, *ILK*]. Using specific biomarkers of human endometrial receptivity, we found that endometrium was non-receptive (29 % and 43 % in OD and RIF OD patients, respectively) or partially receptive (71 and 43 % in OD and RIF OD patients, respectively), at Pg+5/+6, in majority of HRT-treated patients. In OD RIF patients, a delay of the implantation window was observed. However, by targeting personalized embryos transfer by identifying for each patient the HRT-cycle day where endometrium is receptive, with respect of the synchronization of embryo-endometrium dialogue, high pregnancy rate per frozen-thawed embryo replacement (50%) was obtained in OD RIF patients.

Conclusion: This study underlines the need to take into account the individual patient's response to HRT cycles and to move to a patient-tailored care management.

Key words: Endometrial receptivity, HRT, oocyte donation recipients, gene expression, implantation window, Win-Test.

Introduction

Hormonal preparation of the endometrium is a common practice in assisted reproductive technologies (ART) and is considered crucial for recipients of oocyte donation, for infertile women undergoing fresh or frozen embryo replacement and for patients who had several unsuccessful in vitro fertilization (IVF) cycles due to implantation failure. Such hormonal treatments frequently include the sequential administration of oestrogen and progesterone to prepare the uterus to receive the embryo by mimicking the hormonal microenvironment of the endometrium during the implantation window. Oestrogen induces the proliferation of endometrial cells in the basal layer during the first phase of the menstrual cycle and prepares the endometrium to respond to progesterone during the second phase, a necessary step to induce the morphological, biochemical and molecular changes required for endometrium receptivity during the implantation window. Adequate concentrations of both oestrogen and progesterone are therefore essential for optimal endometrial maturation in order to increase the implantation rate and pregnancy chances. Many regimens have been described with different doses, routes and duration of administration of oestrogen and progesterone (Kolibianakis *et al.*, 2008; Glujovsky *et al.*, 2010; van der Linden *et al.*, 2011). However, to date, there is insufficient evidence to advice a specific regimen rather than another. In addition, controversial results have been reported concerning the beneficial effect of luteal phase oestrogen supplementation on implantation and pregnancy rates (Smitz *et al.*, 1993; Lewin *et al.*, 1994; Farhi *et al.*, 2000; Gleicher *et al.*, 2000; Jung and Roh, 2000; Gorkemli *et al.*, 2004; Fatemi *et al.*, 2006; Lukaszuk *et al.*, 2005; Ceyhan *et al.*, 2008; Engmann *et al.*, 2008; Serna *et al.*, 2008). In most reported papers, the strategy for embryos replacement under HRT, is the following one: replacement of day-2/3 embryos and blastocysts stages on the third and fifth day of progesterone administration respectively (Nawroth and Ludwig, 2005; Shapiro *et al.*, 2014). However, what we really know about the endometrial receptivity status at these specific HRT-cycle timing? Using their biomarkers of endometrial receptivity (ERA), a recent study reported a non-receptive endometrial profile under HRT after five days of progesterone treatment in 17 patients undergoing oocyte donation (OD) with implantation failure(s) (RIFs) (Ruiz-Alonso *et al.*, 2014).

Our group previously identified specific biomarkers of human endometrial receptivity (Haouzi *et al.*, 2009; Haouzi *et al.*, 2012). As extensively discussed in Haouzi *et al.* (2012), the number of patients and of endometrial samples used to select a set of genes to develop the two endometrial receptivity tests (Win-Test[®] and ERA test, respectively) were not comparable, leading necessarily to the identification of distinct endometrial receptivity biomarkers.

The aim of our study was to analyse, during the implantation window, (i) the global endometrial gene expression profile, and (ii) the endometrial receptivity exploration by the Win-Test® in candidates for oocyte donation recipients under HRT compared to control group.

Materials and methods

The study was approved by the Ethical Committee of the Institut de Médecine Régénératrice et de Biothérapie.

Patients' characteristics and endometrial biopsies

Patients were recruited after written informed consent.

Patients receiving HRT regimen:

Seven patients without ovarian function and referred for OD (age 34 ± 4.8 years) were recruited for this study from the Fertility Centre of the Institut Mutualiste Montsouris of Paris. Lack of ovarian function in these patients with amenorrhoea of 6 months or more was diagnosed according to their serum follicle stimulating hormone (FSH >30 IU/l), luteinizing hormone (LH >25 IU/ml) and oestradiol level ($E2 < 5 \mu\text{g/ml}$). In these patients, menstrual bleeding can be induced by the sequential use of estrogen plus progestogen. The HRT consisted of a daily oral dose of 4 mg oestradiol (Provames 2 mg, Sanofi-Aventis France) between day 1 and day 6 after the menses for one month supplemented with 400 mg per day of vaginal progesterone suppositories (Utrogestan 200 mg, Besins International France) from day 15 after the beginning of HRT for fourteen days. Menstrual bleeding occurred one to six days after stopping HRT of one treatment cycle. Endometrial biopsies were performed on day twenty of HRT (sixth day after the beginning of progesterone (Pg) administration, corresponding to five days of progesterone treatment; recipient Pg+5 samples). Doppler ultrasonography, serum progesterone and oestradiol measurement were performed at day 14 and day 20 of HRT (Supplementary Table 1). Serum progesterone and oestradiol were measured by using an automated Architect I2000 instrument (Abbott Diagnostic). Intra-assays and inter-assay coefficients of variation (CV) were $< 2.7\%$ and $< 9.1\%$ for progesterone and $< 5\%$ and $< 10\%$ for oestradiol

Twenty OD patients with RIFs (4 ± 0.5) (age 37.2 ± 1.5 years) were also included. Clinical characteristics and outcomes of RIF patients were reported in the Table 1. These patients were under HRT regimen for endometrial receptivity detection using the Win-Test® and thawed-cryopreserved embryo replacement

according to the Win-Test result. HRT regimen involved either a daily oral dose of 6 mg oestradiol (Provames 2 mg x3 / day) or a progressive dose (2 mg/day during 3 days, 4 mg/day during 5 days and 6 mg/day) on day 1-28 combined with 400 or 600 mg per day of progesterone (Utrogestan 200 mg) from days 15-28. In this group, endometrial biopsy was performed between Pg+5 to Pg+8.

Patient's number	Age (years)	Infertility causes	Number of previous failed COS cycles	Number of non-implanted replaced embryos with ovum donation
P1	35	idiopathic	1	2
P2	41.1	idiopathic	2	5
P3	49.75	advanced maternal age, ovarian failure	0	15
P4	37.54	azoospermia and idiopathic	8	8
P5	44.5	idiopathic	8	4
P6	34.75	tubal infertility	3	5
P7	27.75	endometriosis and PCOS	2	9
P8	24.9	endometriosis and spanomenorrhoea	2	5
P9	43	idiopathic	8	9
P10	40.42	endometriosis	3	7
P11	38.33	PCOS and OATS	3	5
P12	34.5	OATS	4	6
P13	42	idiopathic	5	10
P14	36	excretory azoospermia	7	7
P15	32.58	tubal and cervical infertility	6	6
P16	31	male infertility	3	11
P17	34.58	male infertility	2	4
P18	35.66	Dysovulation	6	10
P19	31.66	idiopathic	5	7
P20	49.6	idiopathic, advanced maternal age	3	3

Table 1: Clinical characteristics and outcomes of RIF patients.

PCOS, polycystic ovary syndrome; OATS, oligoasthenoteratozoospermia; COS, controlled ovarian stimulation

Patients in spontaneous cycle used as control:

Twelve patients (age 31.5 ± 3 years), with regular menstrual cycle (28-32 days), followed for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) due to male infertility, were included. Endometrial biopsies were carried out at day 2 (LH+2) and day 7 (LH+7) after the LH surge during the spontaneous cycle. They did not receive any treatment for at least three months before the endometrial biopsy and were included as control group.

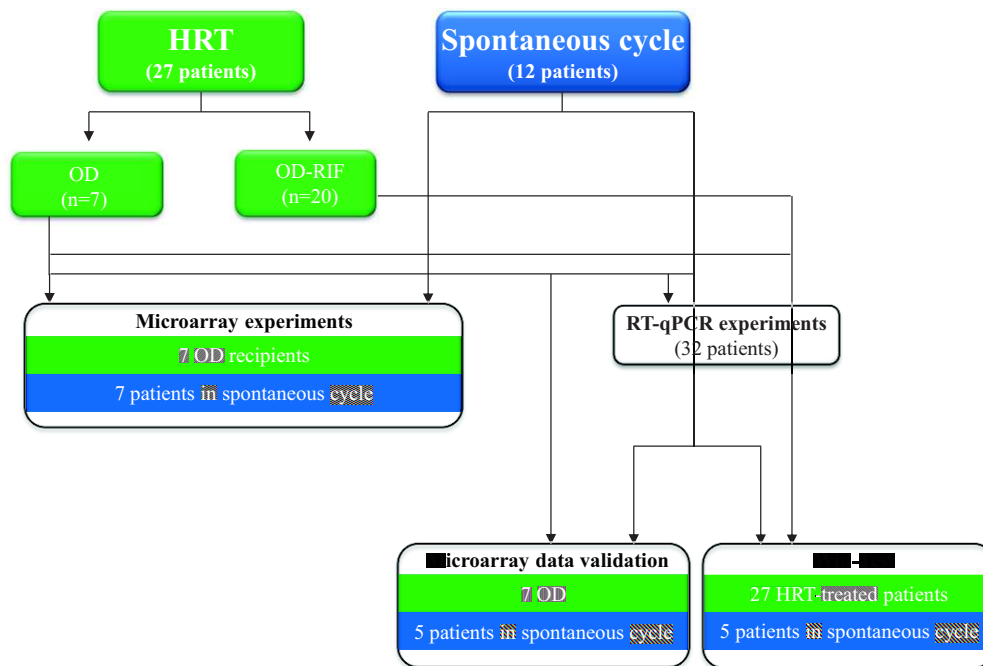


Figure 1: Study design

Endometrial biopsies

After washing with phosphate buffered saline, biopsies were frozen individually at -80°C prior to total RNA extraction with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) (see Fig.1 for the study design).

For microarray experiments, seven LH+7 and seven recipient Pg+5 endometrial samples were used. Five LH+2 samples, five LH+7 samples, seven recipient Pg+5 samples and twenty RIF Pg+5/+8 samples (thus, in total 27 samples from HRT-treated patients) were used for RT-qPCR experiments to validate some microarray data and/or to assess endometrial receptivity using the Win-Test described below.

Microarray hybridization

Affymetrix microarrays were processed at the Microarray Core Facility of the Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy, CHRU-INSERM-UM Montpellier (<http://irmb.chu-montpellier.fr>). Total RNA (100ng) was used to prepare twice-amplified and labelled cRNA samples for hybridization with HG-U133 plus 2.0 arrays (Affymetrix™, United Kingdom, UK) as described in Haouzi *et al.*, 2009. Each endometrial sample was processed individually on a separate DNA microarray chip.

Data processing and microarray data analysis

Scanned GeneChip images were processed using the Affymetrix GCOS 1.4 software to obtain the intensity value signal and the absent/present detection call for each probe set using the default analysis settings and global scaling as first normalization method. Probe intensities were derived using the MAS5.0 algorithm.

To compare endometrial gene expression profiles between HRT-treated recipients and spontaneous cycle patients, first an unsupervised hierarchical clustering of the LH+7 (n=7) and recipient Pg+5 (n=7) samples was performed using the CLUSTER and TREEVIEW software packages (de Hoon *et al.*, 2004). For this, a probe set selection using the detection call (present in at least seven endometrial samples) and a coefficient of variation (CV) $\geq 40\%$ between samples was carried out. Then, the significant analysis of microarrays (SAM, Stanford University, USA, Thusher *et al.*, 2001) was used to identify genes the expression of which varied significantly between LH+7 and recipient Pg+5 endometrial samples. The list of differentially expressed genes (Fold change, FC >2 ; False discovery rate, FDR $< 5\%$) was submitted to Ingenuity (<http://www.ingenuity.com>) to identify the signalling pathways altered by HRT in recipient patients.

The Win-Test[®] : a genomic exploration for the implantation window determination

Our transcriptomic data issues from Haouzi *et al.*, (2009, 2012, 2014) have provide evidence for the identification of 13 specific biomarkers of human endometrial receptivity, that are overexpressed during the implantation window. Then, we developed a test based on the mRNA expression levels of these 13 biomarkers by RT-qPCR that we called the 'Win-Test[®]' (Window Implantation Test) (Patent EP10305561.2; PCT/EP2011/058757). The 'Win-Test[®]' allows to classify endometrial samples obtained during the implantation window as 'receptive' (R), partially receptive (PR) or 'non-receptive' (NR). Partially receptive profile is considered when the expression levels of the 13 biomarkers were situated around 50%.

Replacement strategy according to the Win-Test[®] and pregnancy outcome

The strategy of the personalized embryo transfer consists to perform embryos replacement at blastocyst stage when endometrium is receptive or day-2/3 embryos replacement when endometrium is going to acquire the receptive phenotype (partially receptive).

Quantitative RT-PCR analyses

For the Win-Test[®], 0.5 µg RNA from recipient Pg+5 (n=7) and RIF Pg+5/+8 endometrial samples (n=20) (both from patients receiving HRT) or from LH+7 (n=5) (receptive endometrium; positive control) and LH+2 samples (n=5) (pre-receptive endometrium, negative control) was used for reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). For validation of some genes identified as differentially expressed in the recipient Pg+5 endometrial samples according to the functional annotation of the microarray data, five recipient Pg+5 and five LH+7 endometrial samples were also used. For qPCR, 2 µl of first strand DNA (diluted 1:5) were added to a 10 µl reaction mixture containing 0.25 µM of each primer and 5 µl of 2X LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche, Mannheim, Germany). DNA was amplified for 45 cycles with annealing temperature set at 63°C using the Light Cycler 480 detection system (Roche). Sample expression values were normalized to *PGK1* (Phosphoglycerate kinase 1) expression using the following formula: $E_{\text{tested primer}}^{\Delta Ct} / E_{PGK1}^{\Delta Ct}$ ($E = 10^{-1/\text{slope}}$), $\Delta Ct = Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{unknown}}$, where E corresponds to the efficiency of the PCR reaction. The E value was obtained by a standard curve that varies in function of the primers used. One receptive endometrium sample from a patient in spontaneous cycle (LH+7) was used as control. Each sample was analysed in duplicate and multiple water blanks were included.

Statistical analyses

Statistical analyses of the clinical and RT-qPCR data were performed using the GraphPad InStat 3 software. For clinical data, differences between groups were considered significant when the Student's *t* test gave a P-value < 0.05. For RT-qPCR data, a repartition difference between sample groups was considered significant when the Kruskal-Wallis test (Dunn's multiple comparison test) gave a P-value < 0.05.

Results

Global transcriptomic profiles of OD recipient patients during peri-implantation endometrial period under HRT treatment

We selected 13 924 genes (CV ≥ 40 % and a 'present' detection call in at least seven samples) and then compared their expression in the 14 endometrial samples (seven recipient Pg+5 and seven LH+7 control group, respectively) by performing unsupervised hierarchical clustering (Fig. 2A). A first branch separated most recipient Pg+5 samples (6 out of 7; 86%) from the LH+7 samples, suggesting that the endometrial profile at Pg+5 in HRT-treated OD recipients is different from the profile of receptive endometrial samples

from patients of control group. SAM analysis of the two groups confirmed these findings as 2291 genes were differentially expressed between LH+7 and recipient Pg+5 samples (Fig. 2B). The Doppler parameters were good in all patients and no differences between HRT-treated oocyte-donation recipients were reported.

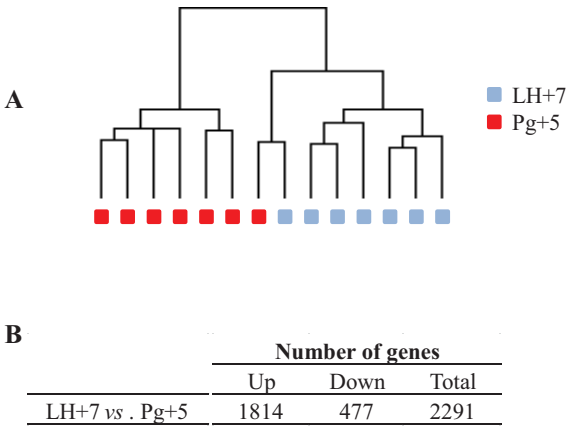


Figure 2: (A) Unsupervised classification with hierarchical clustering of 14 endometrium samples from patients in spontaneous cycles (LH+7, n=7) and recipient patients receiving HRT (Pg+5, n=7). (B) Number of genes that are differentially expressed during the peri-implantation period in the LH+7 and Pg+5 samples shown in A.

Typical peri-implantation endometrial gene expression profile in HRT-treated OD recipients

Analysis of the specific profile of recipient patients at Pg+5 samples using the Ingenuity system identified five canonical signalling pathways that were significantly affected by HRT during the implantation window: ‘oestrogen receptor signalling’, ‘hereditary breast cancer signalling’, ‘VEGF family ligand-receptor interactions’, ‘tumoricidal function of hepatic natural killer cells’ and ‘integrin signalling’ (Table 2 and Fig. 3). The differential expression of some of these genes in recipient Pg+5 and LH+7 endometrial samples was validated by RT-qPCR analysis (Supplementary Fig. 1).

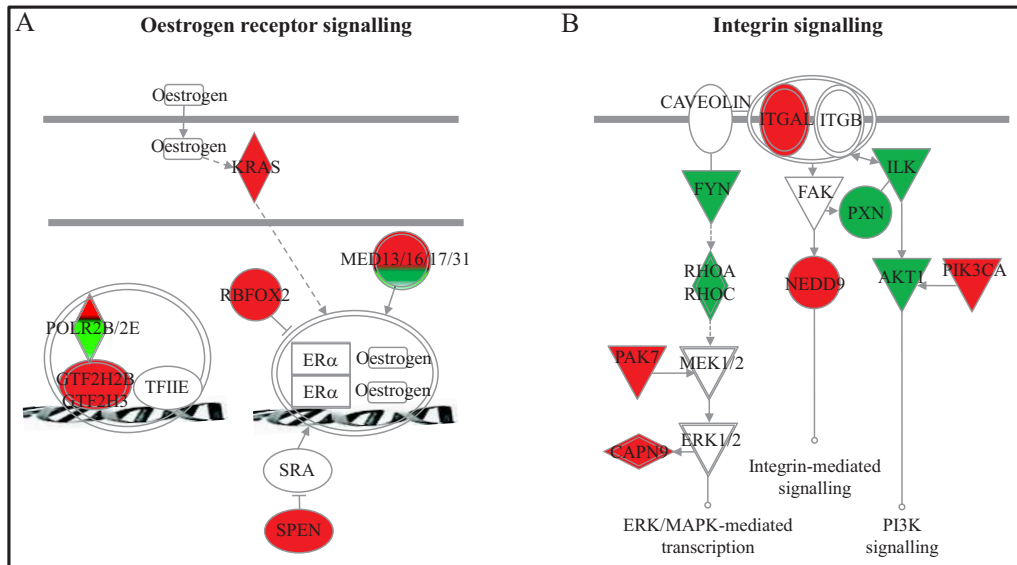


Figure 3: Alteration of oestrogen receptor (ER) (A) and integrin (B) signalling during the implantation window in the endometrium of recipients patients receiving HRT compared to the endometrium of patients in spontaneous cycles (control). In this network, edge types are indicative: a plain line indicates direct interactions, a dashed line indicates indirect interactions, a line without arrowhead indicates binding only, a line finishing with a vertical line indicates inhibition, a line with an arrowhead indicates «acts on». Green, genes down-regulated; Red, genes up-regulated relative to control.

Gene Name	Fold change	FDR
Oestrogen receptor signalling:		
<i>GTF2H2B</i>	2.3	0.03
<i>GTF2H3</i>	2.2	0.002
<i>KRAS</i>	2.1	0.003
<i>RRAS</i>	3	0
<i>MED13</i>	2	0.002
<i>MED16</i>	2	0.003
<i>MED17</i>	2.3	0.03
<i>MED31</i>	2.2	0.02
<i>POLR2B</i>	2.1	0.0004
<i>POLR2E</i>	-2.1	0
<i>TAF15</i>	2.3	0.003
<i>SPEN</i>	2	0.03
<i>RBM9</i>	2.2	0.04
<i>THRAP1</i>	2.9	0.02
<i>HSDL2</i>	2.1	0
<i>RDH5</i>	2.1	0.03
<i>DHRS3</i>	2.1	0.04
<i>DHRSX</i>	2.3	0.03
Hereditary breast cancer signalling:		
<i>AKT1</i>	2.6	0.003
<i>CDK6</i>	2.1	0.01
<i>GADD45B</i>	2.5	0.04
<i>KRAS</i>	2.1	0.003
<i>RCF5</i>	2.2	0
<i>SMARCA2</i>	3.7	0.004
<i>WEE1</i>	2	0.003
<i>PIK3CA</i>	2.2	0.01
VEGF family ligand-receptor interactions:		
<i>VEGFR1</i>	2.9	0.008
<i>VEGFB</i>	2.3	0.004
<i>PLA2G10</i>	2.2	0.04
<i>PLA2G4F</i>	2.2	0.03
Tumoricidal function of hepatic natural killer:		
<i>SRGN</i>	2.3	0.01
<i>APAF1</i>	2.2	0
<i>CASP6</i>	2.1	0.003
<i>ITGAL</i>	2.4	0.01
Integrin signalling:		
<i>CAPN9</i>	2.3	0.04
<i>ITGAL</i>	2.4	0.01
<i>FYN</i>	2.5	0.01
<i>ILK</i>	2.4	0
<i>NEDD9</i>	2.9	0.02
<i>PAK7</i>	5.8	0.04
<i>PPP1CB</i>	2.2	0.015
<i>PXN</i>	2.1	0
<i>RHOA</i>	2	0.003
<i>RHOC</i>	2.1	0
<i>PIK3CA</i>	2.2	0.01
<i>RRAS</i>	3	0

Table 2: Genes associated with canonical signalling pathways that were specifically deregulated in HRT-treated oocyte-donation recipients compared to patients in spontaneous cycle.

Major differences in the expression of genes encoding growth factors, growth factor receptors, adhesion and extracellular matrix molecules in peri-receptive endometrial samples from HRT-treated OD recipients

We then focused on the expression of genes encoding extracellular matrix and adhesion molecules, growth factors and growth factor receptors that play a central role in embryo implantation by controlling the local microenvironment and allowing the endometrium to become receptive. Growth factors, such as *IL7R* (x2.5, FDR=0.042), *FGFR2* (x2.4, FDR=0.005) and *JAG1* (x2.5, FDR=0.01), were over-expressed in peri-receptive recipient at Pg+5 samples, while *OGFR* (x-2.1, FDR=0.005), *VEGFB* (x-2.3, FDR=0.005) and *VEGFR1* (x-2.9, FDR=0.008) were down-regulated. Among chemokines, *CXCL11* (x2.9, FDR=0.02) and *CCR1* (x2.7, FDR=0.04) were up-regulated in recipient Pg+5 samples. Several integrins [*ITGB1BP1* (x-2, FDR=0.003), *ITGAL* (x2.4, FDR=0.01), *ITFG1* (x2.4, FDR=0.04)], collagens [*COL4A3BP* (x3.9, FDR=0.03), *COL4A1* (x2.8, FDR=0.04) and *COL1A2* (x2.2, FDR=0.02)], glycoproteins [*CD44* (x-2.1, FDR=0.01), *CD248* (x-2.2, FDR=0.03) and *CD24* (x-2.3, FDR=0.01) as well as *LAMA5* (-2, FDR=0.04), *ADAMDEC1* (x2.9, FDR=0.04), *TMEM212* (x2.6, FDR=0.04), *TMEM77* (x2.5, FDR=0.03), *TMEM27* (x2.1, FDR=0.02), *TMEM161A* (x-2.1, FDR=0.003), *TMEM204* (x-2.1, FDR=0.004) and *EZR* (x-2.4, FDR=0.01)] were significantly deregulated in recipients at Pg+5 compared to control group.

Endometrial receptivity under HRT in OD recipients and in OD RIF patients: the Win-Test® data

Only one biomarker (KRT80) among the 13 biomarkers showed a similar expression profile in OD recipient samples at Pg+5 and control group (Fig. 4). Analysis of the Win-Test® results in each patient revealed that 71 % of OD recipient samples at Pg+5 were only 'partially receptive' and 29 % were non-receptive (Table 3). In OD RIF patients, 7 have been evaluated at Pg+5/+6 and 10 at Pg+7/+8. At Pg+5/+6, only 14 % of patients were 'receptive', 43 % and 43 % were 'partially' and 'non-receptive' respectively. At Pg+7/+8, majority of evaluated RIF patients were 'receptive' (77%).

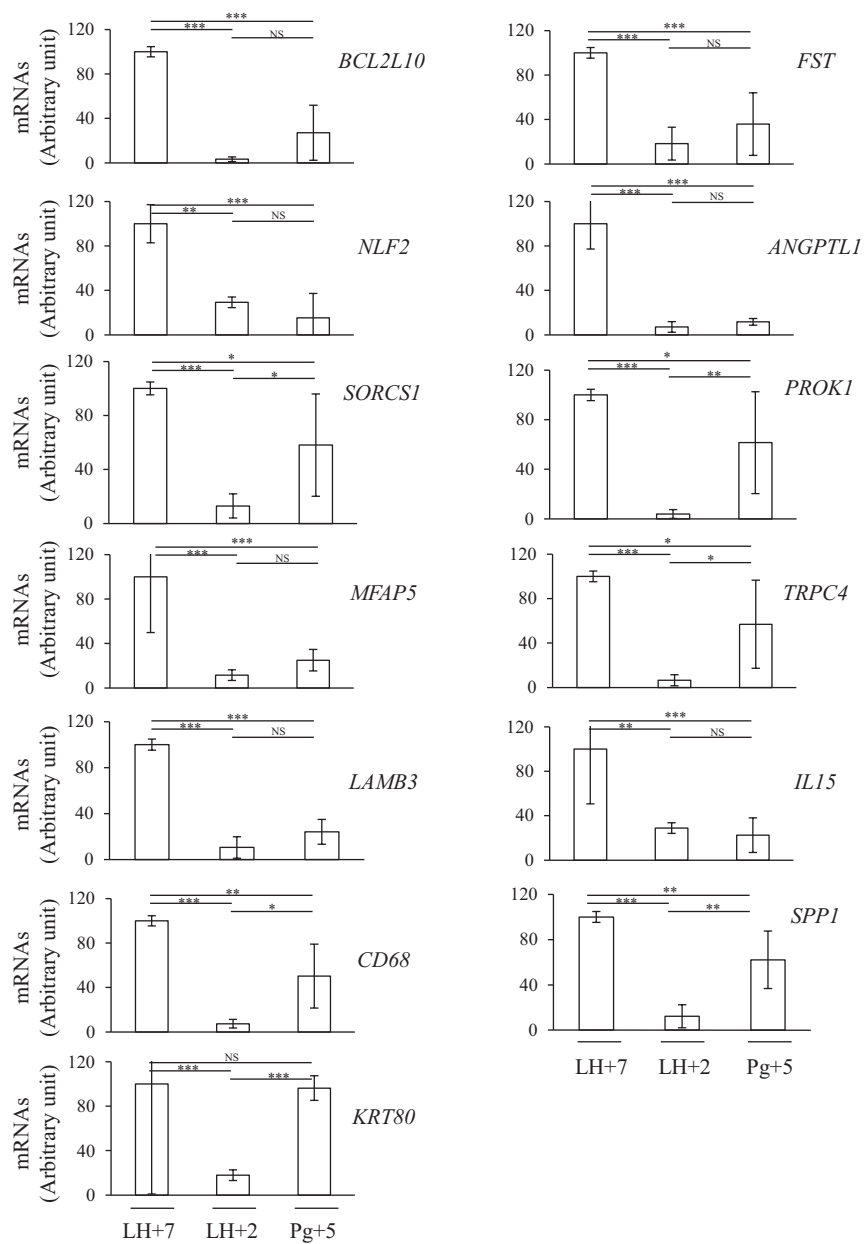


Figure 4: Analysis of the expression of endometrial receptivity biomarkers by RT-qPCR in Pg+5 endometrial samples from recipient patients receiving HRT. Data are the mean $\pm$ SEM. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$ and NS, non-significant compared to the expression values in LH+2 (pre-receptive phase) and LH+7 (receptive phase in spontaneous cycles) endometrial biopsies.

Patient's number	Win-Test's result (biopsy at Pg+5)	Biochemical pregnancy	Clinical pregnancy	Birth
P1	PR	+	+	No (clinical abortion)
P2	PR	+	+	Yes
P3	PR	+	+	Yes
P4	PR	-		
P5	PR	-		
P6	NR	-		
P7	NR	-		

Table 3: Results of the Win-Test® in each HRT-treated oocyte-donation recipient. PR, partially receptive; NR, non-receptive.

On the other hand, after the first endometrial receptivity evaluation, only 50 % of OD RIF patients were receptive, 35 and 15 % were 'partially' and 'non-receptive' respectively, between Pg+5 to Pg+8. All 'non-receptive' patients after the first Win-Test® were diagnosed as 'receptive' after the second evaluation. Among 'receptive' patients, 7, 43, 43, and 7 % were specifically at Pg+6, Pg+7, Pg+8 and Pg+9 respectively (Fig. 5). In OD RIF patients, embryo transfer has been performed according both the Win-Test® result and the cryopreserved embryonic developmental stage (Table 4). In these conditions, the clinical pregnancy rate was 50 % per frozen-thawed embryo replacement.

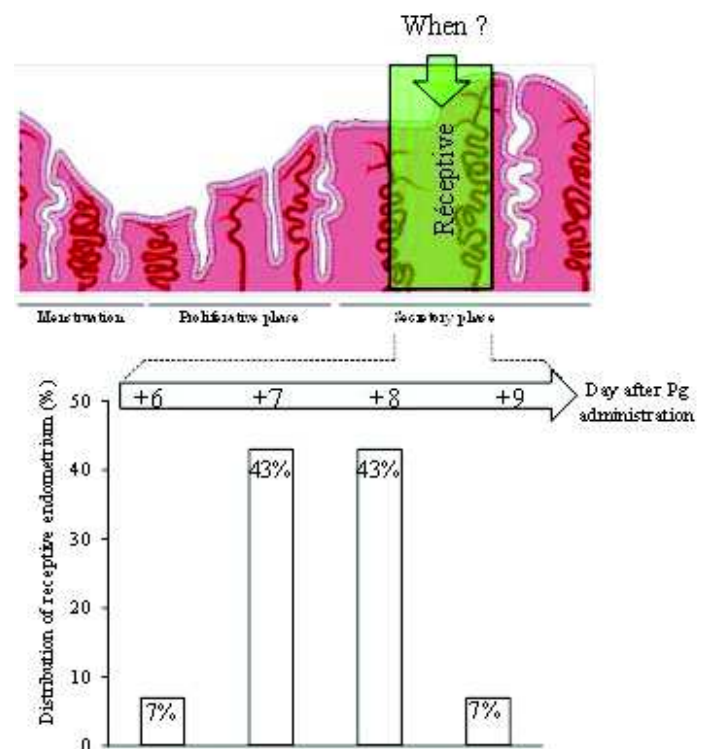


Figure 5: Distribution of receptive samples diagnosed by the Win-Test® results according to the HRT-cycle timing. Pg, progesterone.

Patient's number	Cycle day of the first Win-Test	Result of the first Win-Test	Cycle day of the second Win-Test	Result of the second Win-Test	Cycle day of embryo replacement	Transferred embryonic development stage	Biochemical pregnancy	Clinical pregnancy
P1	Pg+7	R			Pg+5	Day 3 embryo	+	+
P2	Pg+6.5	R			Pg+7.5	Blastocyst	+	+
P3	Pg+6.5	NR	Pg+8	R	Pg+8	Blastocyst	+	+
P4	Pg+6.5	NR	Pg+8	R	Pg+8	Blastocyst	-	
P5	Pg+8	PR			Pg+6	Day 2 embryo	+	+
P6	Pg+8	R			Pg+8	Blastocyst	-	
P7	Pg+7	PR	Pg+9	R	Pg+7	Day 3 embryo	+	+
P8	Pg+7	R			Pg+7	Blastocyst	-	
P9	Pg+7.5	R			Pg+7.5	Blastocyst	-	
P10	Pg+8	PR			Pg+7.5	Day 3 embryo	-	
P11	Pg+7	PR			Pg+7	Day 3 embryo	+	+
P12	Pg+7	R			Pg+7	Blastocyst	-	
P13	Pg+8	R			Pg+8	Blastocyst	-	
P14	Pg+7	R			Pg+7	Blastocyst	-	
P15	Pg+6	NR	Pg+8	R	Pg+8	Blastocyst	+	+
P16	Pg+7	R			Pg+7	Blastocyst	-	
P17	Pg+6	PR			Pg+8	Blastocyst	-	
P18	Pg+8	R			Pg+6	2 day 3 embryos	+	+
P19	Pg+5.5	PR			Pg+7.5	Blastocyst	+	+
P20	Pg+5.5	PR			Pg+5.5	2 day 3 embryos	+	+

Table 4: Results of the Win-Test in each patient with repeated implantation failures.

PR, partially receptive; NR, non-receptive; R, receptive.

Discussion

This study shows that the global gene expression profile of endometrial samples from HRT-treated OD recipients six day after the beginning of progesterone administration is different from the control group. Using the Win test[®] for endometrial receptivity assessment, we did note that the majority of peri-implantation receptive endometrium samples from HRT-treated patients, from both OD recipient patients with or without RIF, presents an inadequate endometrial status after 5/6 days of progesterone treatment with either a 'partially' or 'non-receptive' profile.

Global endometrial gene expression profile during the peri-implantation phase in HRT cycles

In the present study, we analysed the whole endometrial transcriptome at Pg+5 in OD recipient patients under HRT cycle. Using this global approach, we identified significant changes (mainly over-expression) in ECM and adhesion-related genes, including several integrins (*ITGAL*, *ITFG1*, *ITGB1BP1*) and collagens (*COL4A1*, *COL1A2*, *COL4A3BP*), in the endometrium of HRT-supplemented OD recipients. However, none of the ECM and adhesion-related genes identified by Zhao *et al.* (2010) as significantly deregulated during the implantation window in IVF cycles with luteal support was found in the present study. This can be explained by differences in the study design. Nevertheless, none of the genes identified by Zhao *et al.* (2010) was previously reported as potential biomarker of endometrial receptivity in studies comparing the gene expression profiles of pre-receptive and receptive secretory phase endometrium in natural cycles (Haouzi *et al.*, 2012), reinforcing the notion that these genes are specifically deregulated by HRT.

We also found that several growth factors, including members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) system, were altered in patients receiving HRT. Both *VEGFB* and its receptor *VEGFR1* were down-regulated during the peri-implantation period in OD recipient patients under HRT. These genes were previously reported as over-expressed during the implantation window in spontaneous cycles compared to the pre-receptive secretory stage (Carson *et al.*, 2002; Meduri *et al.*, 2000). VEGF is an angiogenic factor with a primary role in blood vessel development in uterine endometrium during embryo implantation and is essential for decidual vascularization (Sidell *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). The *CD44* gene was also down-regulated in HRT-treated oocyte-donation recipients. This gene was previously reported as over-expressed during the implantation window in spontaneous cycles (Mirkin *et al.*, 2005; Talbi *et al.*, 2006; Haouzi *et al.*, 2009, 2011). CD44 is a hyaluronic acid receptor and might play a role in blastocyst attachment by interacting with sulphated proteoglycans expressed by early human embryos (Afify *et al.*, 2006). Dysregulation of these processes can result in defective implantation. Indeed, individual analysis of the microarray data indicated that the expression level of these two genes was lower in OD-donation recipients who did not get pregnant than in those who did get.

Compared to control group, oestrogen receptor signalling was also altered during the peri-implantation period in recipient patients (most genes related to this pathway were up-regulated). Oestrogens and progesterone act via nuclear receptors that function as ligand-activated transcription factors and chromatin modifiers to directly regulate the expression of many genes. Other oestradiol-responsive genes are also regulated by oestrogen receptor via protein-protein interactions. These effects are mediated through co-regulators associated with a multi-subunit DNA-binding complex that includes RNA polymerase II. *POLR2E* was down-regulated in endometrial samples from recipient patients receiving HRT compared to control group, while *POLR2B* was up-regulated. In addition, several genes encoding subunits of the mediator complex (MED), a transcriptional co-activator complex thought to be required for the expression of almost all genes, were up-regulated (*MED13*, *MED17* and *MED31*) in endometrium from HRT-treated recipient patients, but not *MED16* which was down-regulated. These data strongly suggest a still too strong estrogenic action during the luteal phase of oestradiol/progesterone-supplemented cycles compared to control group. It is well known that endometrial maturation for embryo implantation must be achieved by the time of progesterone exposure, and thus, only after sufficient and adequate exposure to oestrogen. However, the identification of the optimal dose of steroids remains a challenge as several recent studies

demonstrated that (i) serum oestradiol levels do not reflect the corresponding endometrial tissue concentration, and (ii) local effects of steroids can be strongly influenced by the local metabolism (Marchais-Oberwinkler *et al.*, 2011; Huhtinen *et al.*, 2012). More precisely, oestrogen concentration in endometrium can be controlled by oestrogen-metabolizing enzymes and specifically by hydroxysteroid dehydrogenase (HSD17B) that regulates the balance between oestradiol and oestrone. In healthy women, the intra-tissue oestradiol concentration is actively reduced in the endometrial secretory phase (compared with the proliferative phase) and is about half of the serum concentration. Here, we found over-expression of *HSDL2*, the gene encoding hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2. Using the Biograph data mining/integration platform, putative functional relations were found between *HSDL2* and oestradiol with intermediate links involving retinol dehydrogenases (RDHs) and dehydrogenases/reductases (DHRs) (Liekens *et al.*, 2011). *RDH5*, *DHR3* and *DHRX* were up-regulated in the peri-implantation endometrium of HRT-treated OD recipients compared to patients in spontaneous cycles. However, their altered expression does not seem to affect the pregnancy outcome, because we did not detect any significant difference in their expression profile by microarray analysis in endometrial samples from pregnant and non-pregnant patients in the OD recipient group. In addition, comparison of the global endometrial gene expression profiles according to the pregnancy outcome (pregnant *versus* non-pregnant) did not highlight any gene-related variables affecting the outcome.

Personalized embryo transfers (PET) according to the Win-Test® results

Based on the molecular analysis of endometrial biopsies during the peri-implantation period at Pg+5/+6, our findings strongly suggest a 'non-optimal receptivity' in most HRT-treated patients. Other studies have previously suggested a lag in endometrial development in artificially prepared cycles and/or non-synchronization between glandular and stromal development (Bourgain *et al.*, 1990; Younis *et al.*, 1991; Nikas *et al.*, 1995; Zenke and Chetkowski, 2004; Ruiz-Alonso *et al.*, 2014). It is not clear to which extent a small lag in endometrial development can affect endometrial receptivity, and subsequently pregnancy outcome. On the other hand, no pregnancy was observed when histologically advanced endometrial maturation exceeded three days (Van Vaerenbergh *et al.*, 2009).

Using previously described biomarkers of endometrial receptivity (Win-Test®), we found that 71% of endometrium samples taken from OD recipients at Pg+5 during HRT were only partially receptive. We did not find any significant difference in the expression of these endometrial receptivity biomarkers relative to

the patients' characteristics (age, BMI), clinical features, endometrial aspect or other Doppler parameters between recipient patients. This is in agreement with previous studies showing that neither endometrial thickness nor Doppler pattern could predict the optimal receptivity and, therefore, the outcome in OD recipients (Check *et al.*, 1993; Zenke and Chetkowski, 2004).

In OD RIF patients, 86% of endometrium samples at Pg+5/+6 were classified as either 'partially' (43%) or 'non-receptive' (43%) by the Win-Test[®]; while at Pg+7/+8, majority were diagnosed as 'receptive' (77%). This response heterogeneity observed at Pg+5/+6 treatment timing is independent of the progesterone dose administered and it seems that treatment duration is an essential factor for complete endometrial maturation. At this specific HRT-cycle timing (Pg+5/+6), majority of ART centres perform blastocyst replacement (Nawroth and Ludwig, 2005; Shapiro *et al.*, 2014). However, our results suggest that endometrium under HRT regimen is receptive not before at least seven days of progesterone treatment. In which measure this maturation delay is due to the patient's characteristics (OD RIF patients) or the reflection of the optimal timing for endometrial preparation under HRT remains a full question. On the other hand, endometria from HRT-treated OD recipients evaluated at Pg+5 were also mainly 'partially receptive', suggesting an incomplete endometrial maturation at this treatment timing. In view of this finding, we can't exclude the possibility that the difference in the global gene expression profile of endometrial samples from HRT-treated oocyte-donation recipients at Pg+5 and control group at LH+7 was not the reflection of this endometrial maturity difference.

This finding underlines the need to take into account the individual patient response to artificial cycles. To this aim, the assessment of endometrial receptivity biomarkers, an easy method applicable in routine ART programmes, can help (i) determining the optimal individual response to HRT, and therefore, (ii) identifying the best embryo transfer timing during artificial supplemented cycles. These considerations, while respecting the synchronization of embryo-endometrium dialogue, could optimize pregnancy rates: day-2/3 embryos replacement when endometrium is partially receptive and blastocyst stage when endometrium is receptive. Although levels are still preliminary, the strategy replacement according to the Win-Test[®] seems promising with 50 % of pregnancy rate per frozen-thawed embryo replacement in OD RIF patients.

The present study demonstrates that majority of HRT-treated patients have a partially receptive endometrium after five/six days of progesterone treatment. This remains compatible with embryos

replacement on day-2/3 developmental stage. In OD RIF Patients, a more response heterogeneousness to the progesterone treatment, at this same HRT-cycle timing, was observed, underlining the necessity to evaluate the endometrial status at this specific timing, to target a personalized patient care management for embryo transfers.

Acknowledgements:

We thank the ART teams for their assistance during this study. We would like to pay our respects to Dr. Paul Cohen-Bacri, who passed away during this study. He was in charge of the ART department of Eylau-Unilabs and participated actively in the present study. This article is dedicated to him.

References

- Afify AM, Craig S, Paulino AF. Temporal variation in the distribution of hyaluronic acid, CD44s, and CD44v6 in the human endometrium across the menstrual cycle. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006;14(3):328-333.
- Bourgain C, Devroey P, Van Waesberghe L, Smits J, Van Steirteghem AC. Effects of natural progesterone on the morphology of the endometrium in patients with primary ovarian failure. *Hum Reprod*. 1990;5(5):537-543.
- Ceyhan ST, Basaran M, Kemal Duru N, Yilmaz A, Göktolga U, Baser I. Use of luteal estrogen supplementation in normal responder patients treated with fixed multidose GnRH antagonist: a prospective randomized controlled study. *Fertil Steril*. 2008;89(6):1827-1830.
- Check JH, Nowroozi K, Choe J, Lurie D, Dietterich C. The effect of endometrial thickness and echo pattern on in vitro fertilization outcome in donor oocyte-embryo transfer cycle. *Fertil Steril*. 1993;59(1):72-75.
- de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. *Bioinformatics* 2004;20:1453-1454.
- Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alamá P, Pellicer A, Simón C. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril*. 2011;95(1):50-60, 60.e1-15.
- Engmann L, DiLuigi A, Schmidt D, Benadiva C, Maier D, Nulsen J. The effect of luteal phase vaginal estradiol supplementation on the success of in vitro fertilization treatment: a prospective randomized study. *Fertil Steril*. 2008;89(3):554-561.
- Farhi J, Weissman A, Steinfeld Z, Shorer M, Nahum H, Levran D. Estradiol supplementation during the luteal phase may improve the pregnancy rate in patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril*. 2000;73(4):761-766.

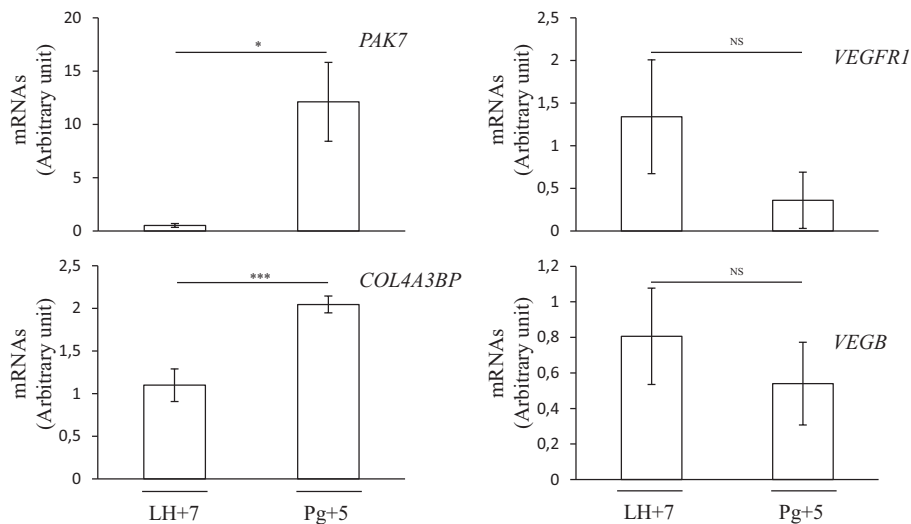
- Fatemi HM, Kolibianakis EM, Camus M, Tournaye H, Donoso P, Papanikolaou E, Devroey P. Addition of estradiol to progesterone for luteal supplementation in patients stimulated with GnRH antagonist/rFSH for IVF: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2006;21(10):2628-2632.
- Garcia-Velasco JA, Motta L, López A, Mayoral M, Cerrillo M, Pacheco A. Low-dose human chorionic gonadotropin versus estradiol/progesterone luteal phase support in gonadotropin-releasing hormone agonist-triggered assisted reproductive technique cycles: understanding a new approach. *Fertil Steril*. 2010;94(7):2820-2823.
- Gleicher N, Brown T, Dudkiewicz A, Karande V, Rao R, Balin M, Campbell D, Pratt D. Estradiol/progesterone substitution in the luteal phase improves pregnancy rates in stimulated cycles—but only in younger women. *Early Pregnancy* 2000;4:64-73.
- Glujovsky D, Pesce R, Fiszbajn G, Sueldo C, Hart RJ, Ciapponi A. Endometrial preparation for women undergoing embryo transfer with frozen embryos or embryos derived from donor oocytes. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(1):CD006359.
- Gorkemli H, Ak D, Akyurek C, Aktan M, Duman S. Comparison of pregnancy outcomes of progesterone or progesterone + estradiol for luteal phase support in ICSI-ET cycles. *Gynecol Obstet Invest*. 2004;58(3):140-144.
- Haouzi D, Bissonnette L, Gala A, Assou S, Entezami F, Perrochia H, Dechaud H, Hugues JN, Hamamah S. Endometrial receptivity profile in patients with premature progesterone elevation on the day of HCG administration. *Biomed Res Int*. 2014;2014:951937.
- Haouzi D, Dechaud H, Assou S, De Vos J, Hamamah S. Insights into human endometrial receptivity from transcriptomic and proteomic data. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(1):23-34.
- Haouzi D, Dechaud H, Assou S, Monzo C, de Vos J, Hamamah S. Transcriptome analysis reveals dialogues between human trophectoderm and endometrial cells during the implantation period. *Hum Reprod*. 2011;26(6):1440-1449.
- Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, Rème T, Dewailly D, Hamamah S. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod*. 2009;24(1):198-205.
- Huhtinen K, Desai R, Ståhle M, Salminen A, Handelsman DJ, Perheentupa A, Poutanen M. Endometrial and endometriot concentrations of estrone and estradiol are determined by local metabolism rather than circulating levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(11):4228-4235.
- Jung H, Roh HK. The effects of E2 supplementation from the early proliferative phase to the late secretory phase of the endometrium in hMGstimulated IVF-ET. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:28-33.
- Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Diedrich K, Tarlatzis BC, Griesinger G. Estrogen addition to progesterone for luteal phase support in cycles stimulated with GnRH analogues and gonadotrophins for IVF: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2008;23(6):1346-1354.

- Lewin A, Benshushan A, Mezker E, Yanai N, Schenker JG, Goshen R. The role of estrogen support during the luteal phase of in vitro fertilization–embryo transplant cycles: a comparative study between progesterone alone and estrogen and progesterone support. *Fertil Steril* 1994;62:121-125.
- Liekens AM, De Knijf J, Daelemans W, Goethals B, De Rijk P, Del-Favero J. BioGraph: unsupervised biomedical knowledge discovery via automated hypothesis generation. *Genome Biol.* 2011;12(6):R57.
- Lukaszuk K, Liss J, Lukaszuk M, Maj B. Optimization of estradiol supplementation during the luteal phase improves the pregnancy rate in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril.* 2005;83(5):1372-1376.
- Marchais-Oberwinkler S, Henn C, Möller G, Klein T, Negri M, Oster A, Spadaro A, Werth R, Wetzel M, Xu K *et al.* 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSDs) as therapeutic targets: protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;125(1-2):66-82.
- Meduri G, Bausero P, Perrot-Applanat M. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the human endometrium: modulation during the menstrual cycle. *Biol Reprod.* 2000;62(2):439-47.
- Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, Bocca S, Oehninger S. In search of candidate genes critically expressed in the endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* 2005;20:2104-1217.
- Nawroth F, Ludwig M. What is the 'ideal' duration of progesterone supplementation before the transfer of cryopreserved-thawed embryos in estrogen/progesterone replacement protocols? *Hum Reprod.* 2005;20(5):1127-34.
- Nikas G, Drakakis P, Loutradis D, Mara-Skoufari C, Koumantakis E, Michalas S, Psychoyos A. Uterine pinopodes as markers of the 'nidation window' in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Hum Reprod.* 1995;10(5):1208-1213.
- Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F, Carrera J, Vilella F, Pellicer A, Simón C. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril.* 2013;100(3):818-824.
- Ruiz-Alonso M, Galindo N, Pellicer A, Simón C. What a difference two days make: "personalized" embryo transfer (pET) paradigm: A case report and pilot study. *Hum Reprod.* 2014;29(6):1244-1247.
- Serna J, Cholquevilque JL, Cela V, Martínez-Salazar J, Requena A, Garcia-Velasco JA. Estradiol supplementation during the luteal phase of IVF-ICSI patients: a randomized, controlled trial. *Fertil Steril.* 2008;90(6):2190-2195.
- Shapiro DB, Pappadakis JA, Ellsworth NM, Hait HI, Nagy ZP. Progesterone replacement with vaginal gel versus i.m. injection: cycle and pregnancy outcomes in IVF patients receiving vitrified blastocysts. *Hum Reprod.* 2014;29(8):1706-11.

- Sidell N, Feng Y, Hao L, Wu J, Yu J, Kane MA, Napoli JL, Taylor RN. Retinoic acid is a cofactor for translational regulation of vascular endothelial growth factor in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol*. 2010;24(1):148-160.
- Smitz J, Bourgain C, Van Waesberghe L, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem AC. A prospective randomized study on oestradiol valerate supplementation in addition to intravaginal micronized progesterone in buserelin and HMG induced superovulation. *Hum Reprod* 1993;8:40-45.
- Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA *et al*. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006;147:1097-1121.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:5116-5121.
- van der Linden M, Buckingham K, Farquhar C, Kremer JA, Metwally M. Luteal phase support for assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;(10):CD009154.
- Van Vaerenbergh I, Van Lommel L, Ghislain V, In't Veld P, Schuit F, Fatemi HM, Devroey P, Bourgain C. In GnRH antagonist/rec-FSH stimulated cycles, advanced endometrial maturation on the day of oocyte retrieval correlates with altered gene expression. *Hum Reprod*. 2009;24(5):1085-1091.
- Wu J, Hansen JM, Hao L, Taylor RN, Sidell N. Retinoic acid stimulation of VEGF secretion from human endometrial stromal cells is mediated by production of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2011;589(Pt 4):863-875.
- Younis JS, Mordel N, Ligovetzky G, Lewin A, Schenker JG, Laufer N. The effect of a prolonged artificial follicular phase on endometrial development in an oocyte donation program. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1991;8(2):84-88.
- Zenke U, Chetkowski RJ. Transfer and uterine factors are the major recipient-related determinants of success with donor eggs. *Fertil Steril*. 2004;82(4):850-856.
- Zhao Y, Garcia J, Kolp L, Cheadle C, Rodriguez A, Vlahos NF. The impact of luteal phase support on gene expression of extracellular matrix protein and adhesion molecules in the human endometrium during the window of implantation following controlled ovarian stimulation with a GnRH antagonist protocol. *Fertil Steril*. 2010;94(6):2264-2271.

		HRT
At Day 14	Number of patients	7
	Age (years)	34 ± 4.8
	[Estradiol] pg/ml	277 ± 145.9
	[Progesterone] ng/ml	0.26 ± 0.07
	Endometrial thickness (mm)	8.1 ± 0.9
	Pulsatility index	R: 1.7 ± 0.3
	(R, right; L, left)	L: 2.2 ± 0.3
At Day 20	[Estradiol] pg/ml	139 ± 61.3
	[Progesterone] ng/ml	11.86 ± 2.35
	Endometrial thickness (mm)	9.2 ± 1.1
	Pulsatility index	R: 1.9 ± 0.5
	(R, right; L, left)	L: 2.0 ± 0.3
	Endometrial histological dating (number of patients)	4 at d16/17 2 at d17/18 1 ND
	β-hCG+ (%)	42.9
	Clinical pregnancy (%)	28.6

Supplementary Table 1: Clinical characteristics and pregnancy outcome in oocyte-donation recipients. ND, not determined.



Supplementary Figure 1: Validation by RT-qPCR of some genes encoding factors related to the signalling pathways the expression of which is altered in the endometrium of HRT-treated oocyte-donation recipients (Pg+5) compared to patients in spontaneous cycle (LH+7 samples).

Data are the mean ± SEM. ***, p < 0.001; *, p < 0.05; NS, non-significant.

Chapitre 6 Discussion générale et perspectives

L'acquisition du phénotype de la réceptivité endométriale est une étape clé de l'implantation de l'embryon humain. Cependant, les mécanismes moléculaires qui régissent la réceptivité endométriale humaine ne sont pas encore complètement élucidés. De plus, les options proposées à l'heure actuelle permettant d'apprécier la réceptivité endométriale dans un cadre clinique ne sont pas optimales. Dans ce contexte, la compréhension des mécanismes moléculaires de l'acquisition de la réceptivité endométriale et le développement d'outils d'appréciation de la réceptivité endométriale répondent donc à un besoin actuel primordial. Mon projet de thèse, 'bio-marqueurs de la réceptivité endométriale : du fondamental aux applications cliniques', cible donc un enjeu médical majeur.

Dans un premier temps, nous avons sélectionné un bio-marqueur de la réceptivité endométriale, S100A10, à partir de nos données transcriptomiques et protéomiques afin de déterminer son(ses) rôle(s) dans l'acquisition du phénotype de la réceptivité endométriale et de l'implantation. Nos données Omics montrent que la protéine S100A10 ainsi que ses ARNm, sont sur-exprimés pendant la fenêtre d'implantation. Nous avons confirmé la sur-expression de ce candidat pendant la fenêtre théorique d'implantation chez des patientes fertiles. De plus, les niveaux d'ARNm de S100A10 sont diminués chez les patientes avec de multiples échecs d'implantation diagnostiquées de non-réceptives par le Win-Test, suggérant un rôle important de cette protéine dans l'acquisition de la réceptivité de l'endomètre. L'extinction de l'expression de S100A10 par shARNs dans les cellules primaires épithéliales et stromales endométriales, purifiées à partir de biopsies endométriales prélevées pendant la fenêtre théorique d'implantation de patientes fertiles, a permis de montrer son rôle clé dans la migration, la décidualisation et l'apoptose des cellules endométriales. En effet, les cellules endométriales S100A10 shARN, épithéliales et stromales, ont démontré une capacité de migration significativement réduite comparativement aux cellules shARN contrôles. Ceci pourrait être en lien avec le rôle de S100A10 dans la transformation du plasminogène en plasmine, une protéase impliquée dans la dégradation de la MEC (O'Connell *et al.*, 2010). De plus, l'extinction de S100A10 affecte le processus de décidualisation aussi bien des cellules stromales que des cellules épithéliales. Alors qu'une diminution de la sécrétion de prolactine est observée dans les cellules stromales, une augmentation marquée de l'expression des ARNm et de la sécrétion de prolactine ont été mesurées dans les cellules épithéliales endométriales. Bien que le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) l'extinction de S100A10 affectent différemment la décidualisation restent à identifier, les résultats démontrent l'implication de cette protéine dans la décidualisation, un processus crucial à l'implantation de

l'embryon. Dans les cellules épithéliales endométriales, l'extinction de S100A10 sensibilise l'apoptose induite par la réduction de sérum. L'apoptose joue un rôle clé pendant la fenêtre d'implantation, car la désintégration de l'épithélium luminal est principalement contrôlée via un phénomène apoptotique, facilitant potentiellement l'invasion du blastocyste (Boeddeker et Hess, 2015). De plus, l'implication du complexe Allt dans le processus d'apoptose a été récemment rapportée (Hitchcock *et al.*, 2014). Finalement, les analyses transcriptomiques des cellules épithéliales et stromales S100A10 shARN ont révélé que 37 et 256 gènes étaient différentiellement exprimés, respectivement, comparativement aux cellules shARN contrôles. Dans les cellules épithéliales, plusieurs gènes des composants de la MEC et des connexions intercellulaires étaient modulés (COL4A5, GJA5). Dans les cellules stromales, les annotations fonctionnelles ont mis en évidence une altération de la migration transendothéliale (VAV3, MPP16) et de la voie de signalisation du TGF- β (ACVR1C, BMPER), des voies de signalisation impliquées dans l'acquisition de la réceptivité endométriale. Cette étude a permis de démontrer le rôle clé de la protéine S100A10 dans des fonctions biologiques majeures de l'acquisition de la réceptivité endométriale et donc de l'implantation embryonnaire.

Par la suite, nous avons implanté le test d'appréciation de la réceptivité endométriale, le Win-Test, dans un centre d'AMP à Montréal (Canada) et initié une étude prospective clinique de l'évaluation de la réceptivité endométriale en cycle naturel pendant la fenêtre théorique d'implantation de patientes en attente d'un traitement par FIV/ICSI. Nous avons ainsi validé la faisabilité du Win-Test dans un autre centre d'AMP, ce qui constitue une étape clé de validation avant la commercialisation de ce test diagnostique. Ensuite, les résultats préliminaires de l'étude prospective démontrent l'hétérogénéité du moment de l'acquisition du statut réceptif de l'endomètre au sein de la fenêtre d'implantation théorique. Ainsi, ces résultats mettent en évidence l'intérêt de modifier les méthodes de transfert embryonnaire actuelles et de prioriser un transfert personnalisé d'embryon en déterminant, pour chaque patiente, le moment où son endomètre est réceptif.

Parallèlement à ces études, nous nous sommes intéressés à l'impact d'une part, de l'augmentation prématurée de la progestéronémie sous traitement de stimulation ovarienne et, d'autre part, des THS sur la réceptivité endométriale.

Au cours d'une stimulation pour FIV/ICSI, le dosage de certaines hormones peut, en effet, avoir une valeur pronostic. Cependant, l'impact de l'élévation de la progestérone plasmatique en fin de phase folliculaire

sous traitement de stimulation ovarienne est, à l'heure actuelle, encore débattu. Alors que certaines études montrent un effet délétère d'une forte concentration de progestérone le jour du déclenchement de l'ovulation sur les taux de grossesse, d'autres études, au contraire, rapportent un effet bénéfique (Kolibianakis *et al.*, 2012 ; Doldi *et al.*, 1999 ; Venetis *et al.*, 2007). Bien que le mécanisme par lequel l'élévation prématurée de la progestéronémie affecte le devenir de la tentative ne soit pas connu, un potentiel impact négatif sur la réceptivité endométriale a été suggéré. En effet, une progestéronémie élevée pourrait favoriser une maturation prématurée de l'endomètre et, en conséquence, un avancement de la fenêtre d'implantation menant à la désynchronisation de la diapause entre l'embryon et l'endomètre. Notre étude rapporte une altération de la transition transcriptomique endométriale au cours des phases pré-réceptives et réceptives chez des patientes ayant un taux élevé de progestérone plasmatique le jour du déclenchement de l'ovulation, suggérant en effet un avancement prématuré de l'endomètre pendant la phase péri-ovulatoire, et ce, sans pour autant affecter le statut de l'endomètre pendant la fenêtre théorique d'implantation. Par conséquent, le transfert d'embryons J3 dans un endomètre trop précocement mature se traduirait par une désynchronisation du dialogue entre l'embryon et l'endomètre. Cette désynchronisation pourrait alors justifier l'effet délétère sur les taux de grossesse après transfert d'embryons J3, 5 jours après le déclenchement de l'ovulation, chez les patientes avec une progestéronémie élevée le jour du déclenchement de l'ovulation (Papanikolaou *et al.*, 2009). Cette problématique devrait être contournée avec le transfert de blastocystes, 7 jours après le déclenchement de l'ovulation. En effet, dans ces conditions, aucun impact négatif d'une progestéronémie élevée sur les taux de grossesse n'a pu être observé (Ochsenkühn *et al.*, 2012). Ces données sont d'une importance capitale puisqu'elles permettent de guider le clinicien dans la prise en charge de patientes sous traitement de stimulation ovarienne présentant une progestéronémie élevée le jour du déclenchement de l'ovulation: cibler des transferts au stade blastocyste ou cryo-préserver dans le cadre d'embryons J2 ou J3 pour un remplacement ultérieur en cycle naturel ou THS.

Les THS sont largement utilisés dans le cadre de la prise en charge de patientes en attente de don d'ovocytes et de transferts d'embryons cryo-préservés. Cependant, à ce jour, il existe très peu de données sur le statut de l'endomètre pendant la fenêtre théorique d'implantation sous THS de patientes en attente de don d'ovocytes. En comparant les profils transcriptomiques d'endomètres prélevés pendant la fenêtre théorique d'implantation de patientes sous THS (après 5 à 6 jours de traitement à la progestérone) à celui de patientes en cycle naturel (7 jours après le pic de LH), nous avons ainsi mis en évidence une signature

spécifique associée au THS. Les annotations fonctionnelles de cette signature révèlent l'altération de la signalisation médiée par les récepteurs aux œstrogènes, des interactions récepteurs-ligands de la famille des facteurs angiogéniques VEGF ainsi que de la signalisation des intégrines. L'appréciation de la réceptivité endométriale par le Win-Test, 5 à 6 jours après l'administration de la progestérone, révèle un endomètre partiellement réceptif (en cours d'acquisition de la réceptivité endométriale) pour les deux tiers des patientes, ce qui reste compatible avec des transferts d'embryons J3. Le reste des patientes présentaient un endomètre non-réceptif à ce moment précis du cycle sous THS. La proportion de patientes non-réceptives après 5/6 jours de traitement à la progestérone augmente de façon drastique chez les patientes sous THS ayant subi au préalable de multiples échecs d'implantation (43%). Chez ces patientes, un retard de la fenêtre d'implantation est observé et leur endomètre ne sera réceptif qu'après 7 à 8 jours de traitement à la progestérone. D'où l'importance de mettre en place un transfert embryonnaire personnalisé en identifiant, pour chaque patiente, le moment où son endomètre est réceptif.

La compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent la réceptivité endométriale se heurte à des difficultés techniques, légales et éthiques empêchant les études *in vivo*. Cet obstacle majeur contraint à étudier ces phénomènes par le biais de modèles animaux ou de développer des modèles *in vitro* respectant la physiologie et l'architecture de l'endomètre pour pouvoir étudier avec pertinence les interactions materno-fœtal. Le modèle de souris mutantes a été largement utilisé, bien que plusieurs aspects du processus d'implantation diffèrent entre l'humain et la souris, limitant ainsi les conclusions pouvant être tirées de ce type de modèle (Lee et DeMayo, 2004). Dans la présente étude, nous avons opté pour l'utilisation de cultures primaires de cellules endométriales purifiées en monocouche à partir de biopsies prélevées pendant la fenêtre théorique d'implantation. Bien que présentant de nombreux avantages par rapport à l'utilisation de lignées cellulaires immortalisées, la culture cellulaire dite classique, c'est à dire en monocouche sur un support plastique, oblige les cellules à s'adapter à des contraintes physiques et environnementales, fortement éloignées de la situation réelle *in vivo*. En effet, la composition et l'organisation topographique de la MEC est un élément essentiel de la survie, de la migration et de la différenciation des cellules épithéliales qui ne peuvent être correctement polarisées, ni subir une différenciation complète que dans un environnement 3D (Walpita et Hay, 2002). Dans ce contexte, les cellules conservent les caractéristiques d'un tissu qui sont cruciales pour les systèmes cellulaires complexes, comme les systèmes épithéliaux. Un défi majeur pour la compréhension des mécanismes de régulation de la réceptivité endométriale réside donc dans le choix d'un système d'étude pertinent pour les aspects de la

physiologie endométriale. Pour des résultats optimaux, ce modèle expérimental devrait prendre en compte les différents types cellulaires du stroma utérin ainsi que l'organisation tridimensionnelle de ce tissu. En effet, la réponse d'une cellule aux stimuli intra- et extracellulaires est largement déterminée par son microenvironnement. À ce jour, quelques modèles de co-culture des cellules épithéliales et stromales endométriales dans un environnement 3D, ont déjà vu le jour. Cependant, ces études ont majoritairement opté pour l'utilisation du collagène I, une MEC non appropriée à la physiologie de l'endomètre (Lalitkumar *et al.*, 2007 ; Teklenburg et Macklon, 2009). En effet, l'exploitation de nos données transcriptomiques et protéomiques montre que la composition de la MEC de l'endomètre est beaucoup plus complexe avec la présence notamment de différents types de collagène, majoritairement de type IV, ainsi que de la fibronectine et laminine (Haouzi *et al.*, 2011). L'utilisation d'un support matriciel plus sophistiqué tel que le matrigel, une MEC extraite à partir de sarcomes de souris riche en laminine, collagène IV et protéoglycanes à héparane sulfate semble donc plus appropriée.

D'autre part, le maintien de la polarité des cellules épithéliales est un enjeu majeur à la mise en place d'un tel modèle expérimental. En effet, la polarité des cellules épithéliales endométriales est nécessaire au processus d'adhésion et d'invasion du blastocyste dans l'endomètre (Bentin-Ley *et al.*, 2000). Cet aspect est d'autant plus important que nos marquages immuno-fluorescents sur des coupes endométriales suggèrent une expression localisée au niveau des membranes baso-latérales des cellules épithéliales luminales et glandulaires de notre candidat S100A10 (figure 1). D'autre part, les transcriptomes des cellules épithéliales et stromales déficientes en S100A10 révèlent l'altération de nombreux composants de la MEC ainsi que des composants des jonctions serrées et communicantes (tableau 1). La détermination du lien entre notre candidat S100A10, la polarité et son implication dans le processus d'implantation ne prendra tout son sens que dans un modèle expérimental approprié.

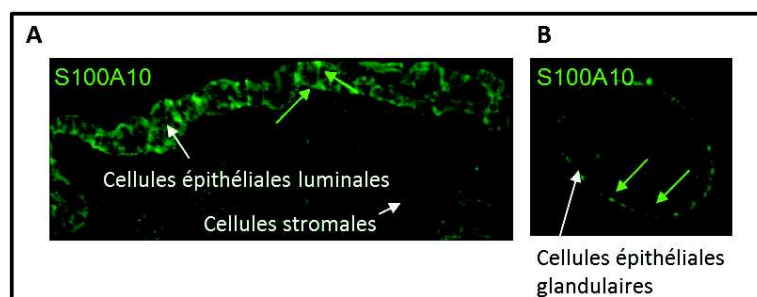


Figure 1 Marquage immuno-fluorescent S100A10

Marquage immuno-fluorescent de la protéine S100A10 sur coupes de tissus endométriaux, (A) section du stroma endométrial entouré par des cellules épithéliales luminales, (B) section d'une glande épithéliale. Les flèches vertes indiquent des membranes baso-latérales des cellules épithéliales avec une forte expression du marquage S100A10.

Pour finir, l'approfondissement de nos connaissances au regard du processus de décidualisation des cellules épithéliales et stromales et de leur(s) communication(s) pendant ce processus dépendra de notre capacité à développer un tel modèle.

Tableau 1 Gènes reliés à la polarité cellulaire, modulées dans les cellules shARN S100A10 épithéliales et stromales endométriales humaines, avec leur fonction respective.

Nom	Symbole	Cellules épithéliales	Cellules stromales	Fonction
Collagen, type IV, alpha 6	COL4A6	x6	x9	Composant MEC
Collagen, type IV, alpha 5	COL4A5	x2,6		Composant MEC
Collagen, type XI, alpha 1	COL11A1		x3,2	Composant MEC
Fibronectin 1	FN1	x2,7		Composant MEC
Laminin, alpha 1	LAMA1		x3,4	Composant MEC
Gap jonction protein, alpha 5	GJA5	x3		Jonctions communicantes
Claudin 11	CLDN11		x8,3	Jonctions serrées
Membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK P55 Subfamily Member 7)	MPP7	x3,2		Adaptateur impliqué dans les jonctions serrées et communicantes
Versican	VCAN	x2,1	x2,3	Protéoglycane
Decorin	DCN		x3,7	Protéoglycane
Fibrodulin	FMOD		x2	Protéoglycane
Melanoma cell adhesion molecule	MCAM		x-2,3	Glycoprotéine
Molécule CD36	CD36		x3,8	Glycoprotéine
Neural cell adhesion molecule 2	NCAM2		x2,2	Molécule d'adhésion
Matrix metalloproteinase 16	MPP16		x2,9	Dégradation MEC
Serpin peptidase inhibitor, clade I	SERPINI1		x3	Inhibe tPA

L'analyse du profil d'expression des microARNs reste une étape indispensable à la compréhension de la physiologie de la réceptivité de l'endomètre. Il existe de nombreuses preuves de l'implication des microARNs dans la régulation des modifications cycliques de l'endomètre au cours du cycle menstruel (Pan et Chegini, 2008, Kuokkanen *et al.*, 2010). Les microARNs (miARNs) sont de courts ARNs non-codant,

d'environ 22 nucléotides, qui influencent la fonction cellulaire en modulant l'activité post-transcriptionnelle de gènes cibles multiples soit en réprimant la traduction soit en dégradant les ARNm. La combinaison des profils transcriptomiques, protéomiques et des microARNs permettrait ainsi l'obtention d'une image cohérente et complète des mécanismes biologiques et des sentiers signalétiques activés pendant la fenêtre d'implantation. D'autre part, il est maintenant bien établi que certains microARNs peuvent se retrouver dans la circulation sanguine et peuvent donc être détectés dans le sérum et le plasma. Nous évaluerons dans quelle mesure les profils des microARNs pourraient être utilisés comme bio-marqueurs de la réceptivité de l'endomètre puis quantifiés dans le sérum et/ou plasma, dans l'objectif de développer un test non invasif permettant de s'affranchir d'une biopsie de l'endomètre. A plus long terme, une vision plus claire des mécanismes moléculaires de régulation de la réceptivité de l'endomètre devrait permettre d'appréhender plus facilement les défauts de la réceptivité endométriale chez des patientes présentant de multiples échecs d'implantation au cours de procédures de FIV. Rappelons que plus de 2/3 des échecs d'implantation sont associés à un défaut de réceptivité de l'endomètre. Par conséquent, il y a un besoin urgent de développer de nouvelles thérapies médicales permettant de restaurer cette réceptivité endométriale. Compte tenu de l'implication possible des microARNs dans la régulation cyclique de l'endomètre, il est probable qu'une expression dérégulée de certains microARNs de l'endomètre pourrait affecter ses fonctions cycliques cruciales, voir même affecter l'acquisition du phénotype réceptif pendant la fenêtre d'implantation. Par conséquent, l'identification de microARNs ou de variation d'expression de microARNs dans les endomètres de patientes présentant de multiples échecs d'implantation en comparaison à des patientes fertiles apparaît donc être un enjeu capital.

En conclusion, ce projet de thèse présente de nouvelles informations pertinentes relatives à la réceptivité endométriale tant sur le plan fondamental que clinique. Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans les stratégies de prise en charge des patientes en AMP. Cependant, de nombreuses questions demeurent et les perspectives d'études sur le sujet restent multiples. Des avancées dans ce domaine sont encore nécessaires pour permettre, à plus long terme, d'optimiser les taux de succès en FIV.

Bibliographie

- AbdelHafez, F. F., Desai, N., Abou-Setta, A. M., Falcone, T. and Goldfarb, J. (2010) 'Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis', *Reprod Biomed Online*, 20(2): 209-22.
- Achache, H. and Revel, A. (2006) 'Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation', *Hum Reprod Update*, 12(6): 731-46.
- Aghajanova, L., Hamilton, A. E. and Giudice, L. C. (2008) 'Uterine receptivity to human embryonic implantation: histology, biomarkers, and transcriptomics', *Semin Cell Dev Biol*, 19(2): 204-11.
- Alcázar, J. L. (2006) 'Three-dimensional ultrasound assessment of endometrial receptivity: a review', *Reprod Biol Endocrinol*, 4(56): 56-69.
- Altmäe, S., Esteban, F. J., Stavreus-Evers, A., Simón, C., Giudice, L., Lessey, B. A., Horcajadas, J. A., Macklon, N. S., D'Hooghe, T., Campoy, C., Fauser, B. C., Salamonsen, L. A. and Salumets, A. (2014) 'Guidelines for the design, analysis and interpretation of 'omics' data: focus on human endometrium', *Hum Reprod Update*, 20(1): 12-28.
- Aplin, J. D. (2007) 'Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive', *Reprod Biomed Online*, 14 Spec No 1: 49-55.
- Baerwald, A. R., Adams, G. P. and Pierson, R. A. (2012) 'Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review', *Hum Reprod Update*, 18(1): 73-91.
- Barash, A., Czernobilsky, B., Insler, V., Borenstein, R., Rosenberg, M. and Fink, A. (1992) 'Endometrial morphology and hormonal profiles in in vitro fertilization patients', *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 44(2): 117-21.
- Basir, G. S., O, W. S., Ng, E. H. and Ho, P. C. (2001) 'Morphometric analysis of peri-implantation endometrium in patients having excessively high oestradiol concentrations after ovarian stimulation', *Hum Reprod*, 16(3): 435-40.
- Bazer, F. W., Spencer, T. E., Johnson, G. A., Burghardt, R. C. and Wu, G. (2009) 'Comparative aspects of implantation', *Reproduction*, 138(2): 195-209.
- Bentin-Ley, U., Horn, T., Sjögren, A., Sorensen, S., Falck Larsen, J. and Hamberger, L. (2000) 'Ultrastructure of human blastocyst-endometrial interactions in vitro', *J Reprod Fertil*, 120(2): 337-50.
- Bentin-Ley, U., Sjögren, A., Nilsson, L., Hamberger, L., Larsen, J. F. and Horn, T. (1999) 'Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro', *Hum Reprod*, 14(2): 515-20.
- Birdsall, M. A., Hopkisson, J. F., Grant, K. E., Barlow, D. H. and Mardon, H. J. (1996) 'Expression of heparin-binding epidermal growth factor messenger RNA in the human endometrium', *Mol Hum Reprod*, 2(1): 31-4.

- Bischof, P. and Campana, A. (2000) 'Molecular mediators of implantation', *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 14(5): 801-14.
- Blesa, D. Ruiz-Alonso, M. and Simón, C. (2014) 'Clinical management of endometrial receptivity' *Semin Reprod Med* 32(5) pp. 140-3.
- Blois, S. M., Klapp, B. F. and Barrientos, G. (2011) 'Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells', *J Reprod Immunol*, 88(2): 86-92.
- Boeddeker, S. J. and Hess, A. P. (2015) 'The role of apoptosis in human embryo implantation', *J Reprod Immunol*, 108: 114-22.
- Borthwick, J. M., Charnock-Jones, D. S., Tom, B. D., Hull, M. L., Teirney, R., Phillips, S. C. and Smith, S. K. (2003) 'Determination of the transcript profile of human endometrium', *Mol Hum Reprod*, 9(1): 19-33.
- Bosch, E., Labarta, E., Crespo, J., Simón, C., Remohí, J., Jenkins, J. and Pellicer, A. (2010) 'Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: analysis of over 4000 cycles', *Hum Reprod*, 25(8): 2092-100.
- Bosch, E., Valencia, I., Escudero, E., Crespo, J., Simón, C., Remohí, J. and Pellicer, A. (2003) 'Premature luteinization during gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles and its relationship with in vitro fertilization outcome', *Fertil Steril*, 80(6): 1444-9.
- Brar, A. K., Frank, G. R., Kessler, C. A., Cedars, M. I. and Handwerger, S. (1997) 'Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP', *Endocrine*, 6(3): 301-7.
- Braude, P., Bolton, V. and Moore, S. (1988) 'Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stages of preimplantation development' *Nature*, 332(6163): 459-61.
- Bresnick, A. R., Weber, D. J. and Zimmer, D. B. (2015) 'S100 proteins in cancer', *Nat Rev Cancer*, 15(2): 96-109.
- Bustillo, M., Stern, J. J. and Coulam, C. B. (1995) 'Serum progesterone at the time of human chorionic gonadotrophin does not predict pregnancy in in-vitro fertilization and embryo transfer' *Hum Reprod*, 10(11):2862-7.
- Campbell, S., Swann, H. R., Seif, M. W., Kimber, S. J. and Aplin, J. D. (1995) 'Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo', *Hum Reprod*, 10(6): 1571-8.
- Carson, D. D., Lagow, E., Thathiah, A., Al-Shami, R., Farach-Carson, M. C., Vernon, M., Yuan, L., Fritz, M. A. and Lessey, B. (2002) 'Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening', *Mol Hum Reprod*, 8(9): 871-9.

- Challis, J. R., Lockwood, C. J., Myatt, L., Norman, J. E., Strauss, J. F. and Petraglia, F. (2009) 'Inflammation and pregnancy', *Reprod Sci*, 16(2): 206-15.
- Chang, C. C., Hsieh, Y. Y., Hsu, K. H. and Lin, C. S. (2011) 'Effects of α and β recombinant FSH (Gonal-F, Puregon) and progesterone upon human endometrial cell proliferation in-vitro: a preliminary study' *Gynecol Endocrinol*, 27(2): 110-6.
- Chaouat, G., Dubanchet, S. and Ledée, N. (2007) 'Cytokines: Important for implantation?', *J Assist Reprod Genet*, 24(11): 491-505.
- Chapel, H., Haeney, M., Misbah, S. and Snowden, N. (2004) *Immunologie clinique: De la théorie à la pratique, avec cas clinique*. De Boeck, Bruxelles, 358 p.
- Chen, G. A., Feng, Q., Zhang, L. Z. and Liu, Y. X. (1992) '[Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor type-1 in human endometrium]', *Sheng Li Xue Bao*, 44(5): 502-9.
- Chen, J. I., Hannan, N. J., Mak, Y., Nicholls, P. K., Zhang, J., Rainczuk, A., Stanton, P. G., Robertson, D. M., Salamonsen, L. A. and Stephens, A. N. (2009) 'Proteomic characterization of midproliferative and midsecretory human endometrium', *J Proteome Res*, 8(4): 2032-44.
- Chen, Q., Zhang, A., Yu, F., Gao, J., Liu, Y., Yu, C., Zhou, H. and Xu, C. (2015) 'Label-free proteomics uncovers energy metabolism and focal adhesion regulations responsive for endometrium receptivity', *J Proteome Res*, 14(4): 1831-42.
- Coutifaris, C., Myers, E. R., Guzick, D. S., Diamond, M. P., Carson, S. A., Legro, R. S., McGovern, P. G., Schlaff, W. D., Carr, B. R., Steinkampf, M. P., Silva, S., Vogel, D. L., Leppert, P. C. and Network, N. N. C. R. M. (2004) 'Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status', *Fertil Steril*, 82(5): 1264-72.
- Das, S. K., Chakraborty, I., Paria, B. C., Wang, X. N., Plowman, G. and Dey, S. K. (1995) 'Amphiregulin is an implantation-specific and progesterone-regulated gene in the mouse uterus', *Mol Endocrinol*, 9(6): 691-705.
- Davis, B. J., Lennard, D. E., Lee, C. A., Tiano, H. F., Morham, S. G., Wetzel, W. C. and Langenbach, R. (1999) 'Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta', *Endocrinology*, 140(6): 2685-95.
- Deligdisch, L. (1993) 'Effects of hormone therapy on the endometrium', *Mod Pathol*, 6(1): 94-103.
- Deryugina, E. I. and Quigley, J. P. (2012) 'Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme', *J Biomed Biotechnol*, 2012 : 564259.
- DeSouza, L., Diehl, G., Yang, E. C., Guo, J., Rodrigues, M. J., Romaschin, A. D., Colgan, T. J. and Siu, K. W. (2005) 'Proteomic analysis of the proliferative and secretory phases of the human endometrium: protein identification and differential protein expression', *Proteomics*, 5(1): 270-81.

- Díaz-Gimeno, P., Horcajadas, J. A., Martínez-Conejero, J. A., Esteban, F. J., Alamá, P., Pellicer, A. and Simón, C. (2011) 'A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature', *Fertil Steril*, 95(1): 50-60.e1-15.
- Díaz-Gimeno, P., Ruíz-Alonso, M., Blesa, D. and Simón, C. (2014) 'Transcriptomics of the human endometrium', *Int J Dev Biol*, 58(2-4): 127-37.
- Dobson, A.T., Raja, R., Abeyta, M.J., Taylor, T., Shen, S., Haqq, C. and Reijo Pera, R.A. (2004) 'The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation' *Hum Mol Genet*, 13(14): 1461-70.
- Doldi, N., Marsiglio, E., Destefani, A., Gessi, A., Merati, G. and Ferrari, A. (1999) 'Elevated serum progesterone on the day of HCG administration in IVF is associated with a higher pregnancy rate in polycystic ovary syndrome', *Hum Reprod*, 14(3): 601-5.
- Domínguez, F., Garrido-Gómez, T., López, J. A., Camafeita, E., Quiñonero, A., Pellicer, A. and Simón, C. (2009) 'Proteomic analysis of the human receptive versus non-receptive endometrium using differential in-gel electrophoresis and MALDI-MS unveils stathmin 1 and annexin A2 as differentially regulated', *Hum Reprod*, 24(10): 2607-17.
- Donato, R. (2003) 'Intracellular and extracellular roles of S100 proteins', *Microsc Res Tech*, 60(6): 540-51.
- Donato, R., Cannon, B. R., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., Weber, D. J. and Geczy, C. L. (2013) 'Functions of S100 proteins', *Curr Mol Med*, 13(1): 24-57.
- Eckert, R. L., Broome, A. M., Ruse, M., Robinson, N., Ryan, D. and Lee, K. (2004) 'S100 proteins in the epidermis', *J Invest Dermatol*, 123(1): 23-33.
- Edelstein, M. C., Seltman, H. J., Cox, B. J., Robinson, S. M., Shaw, R. A. and Muasher, S. J. (1990) 'Progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin administration in cycles with gonadotropin-releasing hormone agonist suppression are not predictive of pregnancy outcome' *Fertil Steril*, 54(5):853-7.
- ESHRE 'Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE'. *ESHRE*
- Evans, G. E., Martínez-Conejero, J. A., Phillipson, G. T., Simón, C., McNoe, L. A., Sykes, P. H., Horcajadas, J. A., Lam, E. Y., Print, C. G., Sin, I. L. and Evans, J. J. (2012) 'Gene and protein expression signature of endometrial glandular and stromal compartments during the window of implantation', *Fertil Steril*, 97(6): 1365-73.e1-2.
- Ferenczy, A., Bertrand, G. and Gelfand, M. M. (1979) 'Proliferation kinetics of human endometrium during the normal menstrual cycle', *Am J Obstet Gynecol*, 133(8): 859-67.
- Fleming, R., Seifer, D.B., Frattarelli, J. and Ruman, J (2015) 'Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone', *Reprod BioMed Online*, 31: 486-96.

- Franasiak, J.M., Forman, E.J., Hong, K.H., Werner, M.D., Upham, K.M., Treff, N.R., Scott, R.T. (2014a) 'The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening' *Fertil Steril*, 101(3) pp. 656–663.e1.
- Franasiak, J.M., Forman, E.J., Hong, K.H., Werner, M.D., Upham, K.M., Treff, N.R., Scott, R.T. (2014b) 'Aneuploidy across individual chromosomes at the embryonic level in throphecdoderm biopsies: change with patient age and chromosome structure' *J Assit Reprod Genet*, 31(11): 1501-9.
- Gardner, D. K. and Schoolcraft, W. B. (1999) 'Culture and transfer of human blastocysts', *Curr Opin Obstet Gynecol*, 11(3): 307-11.
- Gellersen, B., Brosens, I. A. and Brosens, J. J. (2007) 'Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives', *Semin Reprod Med*, 25(6): 445-53.
- Gellersen, B. and Brosens, J. (2003) 'Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair', *J Endocrinol*, 178(3): 357-72.
- Genbacev, O. D., Prakobphol, A., Foulk, R. A., Krtolica, A. R., Ilic, D., Singer, M. S., Yang, Z. Q., Kiessling, L. L., Rosen, S. D. and Fisher, S. J. (2003) 'Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface', *Science*, 299(5605): 405-8.
- Girard, C., Tinel, N., Terrenoire, C., Romey, G., Lazdunski, M. and Borsotto, M. (2002) 'p11, an annexin II subunit, an auxiliary protein associated with the background K⁺ channel, TASK-1', *EMBO J*, 21(17): 4439-48.
- Giudice, L. C. (2003) 'Elucidating endometrial function in the post-genomic era', *Hum Reprod Update*, 9(3): 223-35.
- Glasser, S. R., Aplin, J. D., Giudice, L. C. and Tabibzadeh, S. (2002) *The endometrium*. Taylor & Francis, FL, Etat-Unis, 696 p.
- Godier, A. and Hunt, B. J. (2013) 'Plasminogen receptors and their role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune and malignant disease', *J Thromb Haemost*, 11(1): 26-34.
- Gómez, E., Ruíz-Alonso, M., Miravet, J. and Simón C. (2015) 'Human Endometrial Transcriptomics: Implications for Embryonic Implantation' *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5(7):a022996.
- González, R. R., Caballero-Campo, P., Jasper, M., Mercader, A., Devoto, L., Pellicer, A. and Simon, C. (2000) 'Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst', *J Clin Endocrinol Metab*, 85(12): 4883-8.
- Grieve, A. G., Moss, S. E. and Hayes, M. J. (2012) 'Annexin A2 at the interface of actin and membrane dynamics: a focus on its roles in endocytosis and cell polarization', *Int J Cell Biol*, 2012, 852430.

- Groenewoud, E. R., Cantineau, A. E., Kollen, B. J., Macklon, N. S. and Cohlen B. J. (2013) 'What is the optimal means of preparing the endometrium in frozen–thawed embryo transfer cycles? A systematic review and meta-analysis', *Human Reprod Update*, 19(5): 458-70.
- Groome, N.P., Illingworth, P.J., O'Brien, M., Pai, R., Rodger, F.E., Mather, J.P. and McNeilly, A.S. (1996) 'Measurement of dimetric inhibin B throughout the human menstrual cycle', *J Clin Endocrinol Metab*, 81(4): 1401-5.
- Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T. I., Manaster, I., Gazit, R., Yutkin, V., Benharroch, D., Porgador, A., Keshet, E., Yagel, S. and Mandelboim, O. (2006) 'Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface', *Nat Med*, 12(9): 1065-74.
- Hannan, N. J. and Salamonsen, L. A. (2008) 'CX3CL1 and CCL14 regulate extracellular matrix and adhesion molecules in the trophoblast: potential roles in human embryo implantation', *Biol Reprod*, 79(1): 58-65.
- Haouzi, D., Assou, S., Dechanet, C., Anahory, T., Dechaud, H., De Vos, J. and Hamamah, S. (2010) 'Controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization alters endometrial receptivity in humans: protocol effects', *Biol Reprod*, 82(4): 679-86.
- Haouzi, D., Assou, S., Mahmoud, K., Tondeur, S., Rème, T., Hedon, B., De Vos, J. and Hamamah, S. (2009a) 'Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients', *Hum Reprod*, 24(6): 1436-45.
- Haouzi, D., Bissonnette, L., Gala, A., Assou, S., Entezami, F., Perrochia, H., Dechaud, H., Hugues, J. N. and Hamamah, S. (2014) 'Endometrial receptivity profile in patients with premature progesterone elevation on the day of HCG administration', *Biomed Res Int*, 2014, 951937.
- Haouzi, D., Dechaud, H., Assou, S., De Vos, J. and Hamamah, S. (2012) 'Insights into human endometrial receptivity from transcriptomic and proteomic data', *Reprod Biomed Online*, 24(1): 23-34.
- Haouzi, D., Dechaud, H., Assou, S., Monzo, C., de Vos, J. and Hamamah, S. (2011) 'Transcriptome analysis reveals dialogues between human trophectoderm and endometrial cells during the implantation period', *Hum Reprod*, 26(6): 1440-9.
- Haouzi, D., Mahmoud, K., Fourar, M., Bendhaou, K., Dechaud, H., De Vos, J., Rème, T., Dewailly, D. and Hamamah, S. (2009b) 'Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle', *Hum Reprod*, 24(1): 198-205.
- Harder, T. and Gerke, V. (1993) 'The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin IIp11(2) complex', *J Cell Biol*, 123(5): 1119-32.
- Henriquez, S., Tapia, A., Quezada, M., Vargas, M., Cardenas, H., Rios, M., Salvatierra, A. M., Croxatto, H., Orihuela, P., Zegers-Hochschild, F., Munroe, D. J. and Velasquez, L. (2006) 'Deficient expression of

- monoamine oxidase A in the endometrium is associated with implantation failure in women participating as recipients in oocyte donation', *Mol Hum Reprod*, 12(12): 749-54.
- Hitchcock, J. K., Katz, A. A. and Schäfer, G. (2014) 'Dynamic reciprocity: the role of annexin A2 in tissue integrity', *J Cell Commun Signal*, 8(2): 125-33.
- Hofmann, G. E., Khoury, J., Johnson, C.A., Thie, J. and Scott, R.T. Jr. (1996) 'Premature luteinization during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization-embryo transfer has no impact on pregnancy outcome' *Fertil Steril*, 66(6):980-6.
- Horcajadas, J. A., Mínguez, P., Dopazo, J., Esteban, F. J., Domínguez, F., Giudice, L. C., Pellicer, A. and Simón, C. (2008) 'Controlled ovarian stimulation induces a functional genomic delay of the endometrium with potential clinical implications', *J Clin Endocrinol Metab*, 93(11): 4500-10.
- Horcajadas, J. A., Riesewijk, A., Polman, J., van Os, R., Pellicer, A., Mosselman, S. and Simón, C. (2005) 'Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles', *Mol Hum Reprod*, 11(3): 195-205.
- Horne, A. W., Lalani, E. N., Margara, R. A., Ryder, T. A., Mobberley, M. A. and White, J. O. (2005) 'The expression pattern of MUC1 glycoforms and other biomarkers of endometrial receptivity in fertile and infertile women', *Mol Reprod Dev*, 72(2): 216-29.
- Hugues, J. N. (2012) 'Impact of 'LH activity' supplementation on serum progesterone levels during controlled ovarian stimulation: a systematic review. ', *Hum Reprod*, 27(1): 232-43.
- Huppertz, B., Kertschanska, S., Demir, A. Y., Frank, H. G. and Kaufmann, P. (1998) 'Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta', *Cell Tissue Res*, 291(1): 133-48.
- Jansen, R.P., Bowman, M.C, De Boer, K.A., Leigh, D.A., Lieberman, D.B. and McArthur, S.J. (2008) 'What next for preimplantation genetic screening (PGS)? Experience with blastocyst biopsy and testing for aneuploidy' *Hum Reprod*, 23(7): 1476-8.
- Johnson, G. A., Burghardt, R. C. and Bazer, F. W. (2014) 'Osteopontin: a leading candidate adhesion molecule for implantation in pigs and sheep', *J Anim Sci Biotechnol*, 5(1): 56.
- Jones, R. L., Stoikos, C., Findlay, J. K. and Salamonsen, L. A. (2006) 'TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta', *Reproduction*, 132(2): 217-32.
- Jung, M. J., Murzik, U., Wehder, L., Hemmerich, P. and Melle, C. (2010) 'Regulation of cellular actin architecture by S100A10', *Exp Cell Res*, 316(7): 1234-40.
- Kao, L. C., Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., Yang, J. P., Germeyer, A., Osteen, K., Taylor, R. N., Lessey, B. A. and Giudice, L. C. (2002) 'Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation', *Endocrinology*, 143(6): 2119-38.

- King, A. (2000) 'Uterine leukocytes and decidualization', *Hum Reprod Update*, 6(1): 28-36.
- King, A., Balendran, N., Wooding, P., Carter, N. P. and Loke, Y. W. (1991) 'CD3- leukocytes present in the human uterus during early placentation: phenotypic and morphologic characterization of the CD56++ population', *Dev Immunol*, 1(3): 169-90.
- King, A., Burrows, T., Verma, S., Hiby, S. and Loke, Y. W. (1998) 'Human uterine lymphocytes', *Hum Reprod Update*, 4(5): 480-5.
- Kitaya, K., Yamaguchi, T. and Honjo, H. (2005) 'Central role of interleukin-15 in postovulatory recruitment of peripheral blood CD16(-) natural killer cells into human endometrium', *J Clin Endocrinol Metab*, 90(5): 2932-40.
- Klentzeris, L. D. (1997) 'The role of endometrium in implantation', *Hum Reprod*, 12(11 Suppl): 170-5.
- Kliman, H. J. (2000) 'Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion', *Am J Pathol*, 157(6): 1759-68.
- Knapinska, A. and Fields, G. B. (2012) 'Chemical biology for understanding matrix metalloproteinase function', *Chembiochem*, 13(14): 2002-20.
- Kolibianakis, E., Bourgain, C., Albano, C., Osmanagaoglu, K., Smits, J., Van Steirteghem, A. and Devroey, P. (2002) 'Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up', *Fertil Steril*, 78(5): 1025-9.
- Kolibianakis, E. M., Venetis, C. A., Bontis, J. and Tarlatzis, B. C. (2012) 'Significantly lower pregnancy rates in the presence of progesterone elevation in patients treated with GnRH antagonists and gonadotrophins: a systematic review and meta-analysis', *Curr Pharm Biotechnol*, 13(3): 464-70.
- Kube, E., Becker, T., Weber, K. and Gerke, V. (1992) 'Protein-protein interaction studied by site-directed mutagenesis. Characterization of the annexin II-binding site on p11, a member of the S100 protein family', *J Biol Chem*, 267(20): 14175-82.
- Kumar, S., Zhu, L. J., Polihronis, M., Cameron, S. T., Baird, D. T., Schatz, F., Dua, A., Ying, Y. K., Bagchi, M. K. and Bagchi, I. C. (1998) 'Progesterone induces calcitonin gene expression in human endometrium within the putative window of implantation', *J Clin Endocrinol Metab*, 83(12): 4443-50.
- Kuokkanen, S., Chen, B., Ojalvo, L., Benard, L., Santoro, N. and Pollard, J. W. (2010) 'Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium', *Biol Reprod*, 82(4): 791-801.
- Lalitkumar, P. G., Lalitkumar, S., Meng, C. X., Stavreus-Evers, A., Hambiliki, F., Bentin-Ley, U. and Gemzell-Danielsson, K. (2007) 'Mifepristone, but not levonorgestrel, inhibits human blastocyst attachment to an in vitro endometrial three-dimensional cell culture model', *Hum Reprod*, 22(11): 3031-7.

- La Marca, A., Broekmans, F.J., Volpe, A., Fauser, B.C. and Macklon, N.S. (2009) 'Anti-Müllerian hormone (AMH): what do we still need to know?' *Hum Reprod*, 24: 2264-75.
- Lédée, N., Chaouat, G., Serazin, V., Lombroso, R., Dubanchet, S., Oger, P., Louafi, N. and Ville, Y. (2008) 'Endometrial vascularity by three-dimensional power Doppler ultrasound and cytokines: a complementary approach to assess uterine receptivity', *J Reprod Immunol*, 77(1): 57-62.
- Lédée, N., Petitbarat, M., Rahmati, M., Dubanchet, S., Chaouat, G., Sandra, O., Perrier-d'Hauterive, S., Munaut, C. and Foidart, J. M. (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.
- Lédée-Bataille, N., Bonnet-Chea, K., Hosny, G., Dubanchet, S., Frydman, R. and Chaouat, G. (2005) 'Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure', *Fertil Steril*, 83(3): 598-605.
- Lee, K. Y. and DeMayo, F. J. (2004) 'Animal models of implantation', *Reproduction*, 128(6): 679-95.
- Lessey, B. A., Damjanovich, L., Coutifaris, C., Castelbaum, A., Albelda, S. M. and Buck, C. A. (1992) 'Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle', *J Clin Invest*, 90(1): 188-95.
- Levi Setti, P. E., Colombo, G. V., Savasi, V., Bulletti, C., Albani, E. and Ferrazzi, E. (2004) 'Implantation failure in assisted reproduction technology and a critical approach to treatment', *Ann N Y Acad Sci*, 1034: 184-99.
- Li, J., Tan, Z., Li, M., Xia, T., Liu, P. and Yu, W. (2011) 'Proteomic analysis of endometrium in fertile women during the prereceptive and receptive phases after luteinizing hormone surge', *Fertil Steril*, 95(3): 1161-3.
- Li, J., Tan, Z., Li, M. T., Liu, Y. L., Liu, Q., Gu, X. F., Zhou, J. Z. and Zhuang, G. L. (2006) '[Study of altered expression of annexin IV and human endometrial receptivity]', *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 41(12): 803-5.
- Li, R., Qiao, J., Wang, L., Zhen, X. and Lu, Y. (2008) 'Serum progesterone concentration on day of HCG administration and IVF outcome' *Reprod Biomed Online*, 16(5): 627-31.
- Li, X. F., Charnock-Jones, D. S., Zhang, E., Hiby, S., Malik, S., Day, K., Licence, D., Bowen, J. M., Gardner, L., King, A., Loke, Y. W. and Smith, S. K. (2001) 'Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells', *J Clin Endocrinol Metab*, 86(4): 1823-34.
- Liu, Q., Yan, X., Li, Y., Zhang, Y., Zhao, X. and Shen, Y. (2004) 'Pre-eclampsia is associated with the failure of melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) expression by intermediate trophoblast', *Lab Invest*, 84(2): 221-8.
- Liu, Y., Lee, K. F., Ng, E. H., Yeung, W. S. and Ho, P. C. (2008) 'Gene expression profiling of human peri-implantation endometria between natural and stimulated cycles', *Fertil Steril*, 90(6): 2152-64.

- Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N. and Yancopoulos, G. D. (1997) 'Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis', *Science*, 277(5322): 55-60.
- Margarit, L., Gonzalez, D., Lewis, P. D., Hopkins, L., Davies, C., Conlan, R. S., Joels, L. and White, J. O. (2009) 'L-selectin ligands in human endometrium: comparison of fertile and infertile subjects', *Hum Reprod*, 24(11): 2767-77.
- Martín, J., Domínguez, F., Avila, S., Castrillo, J. L., Remohí, J., Pellicer, A. and Simón, C. (2002) 'Human endometrial receptivity: gene regulation', *J Reprod Immunol*, 55(1-2): 131-9.
- Martínez, F., Coroleu, B., Clua, E., Tur, R., Buxaderas, R., Parera, N., Barri, P. N. and Balasch, J. (2004) 'Serum progesterone concentrations on the day of HCG administration cannot predict pregnancy in assisted reproduction cycles' *Reprod BioMed Online*, 8(2): 183-90.
- Mastenbroek, S., Twisk, M., Van Der Veen, F. and Repping, S. (2011) 'Preimplantation genetic sceening a systematic review and meta-analysis of RCTs' *Human Reprod Update*, 17(4): 454-66.
- McKiernan, E., McDermott, E. W., Evoy, D., Crown, J. and Duffy, M. J. (2011) 'The role of S100 genes in breast cancer progression', *Tumour Biol*, 32(3): 441-50.
- Meseguer, M., Pellicer, A. and Simón, C. (1998) 'MUC1 and endometrial receptivity', *Mol Hum Reprod*, 4(12): 1089-98.
- Messinis, I.E. (2006) 'Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications', *Hum Reprod Update* 12(5): 557-571.
- Messinis, I.E., Messini, C. and Dafopoulos, K. (2014) 'Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle', *Reprod BioMe. Online*, 28(6): 714-722.
- Miller, W. L. (1998) 'Steroid hormone biosynthesis and actions in the materno-feto-placental unit', *Clin Perinatol*, 25(4): 799-817.
- Mirkin, S., Arslan, M., Churikov, D., Corica, A., Diaz, J. I., Williams, S., Bocca, S. and Oehninger, S. (2005) 'In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation', *Hum Reprod*, 20(8): 2104-17.
- Mirkin, S., Nikas, G., Hsiu, J. G., Díaz, J. and Oehninger, S. (2004) 'Gene expression profiles and structural/functional features of the peri-implantation endometrium in natural and gonadotropin-stimulated cycles', *J Clin Endocrinol Metab*, 89(11): 5742-52.
- Moffitt, D. V., Queenan, J. T. Jr, Shaw, R. and Muasher, S. J. (1997) 'Progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin do not predict pregnancy outcome from the transfer of fresh or cryopreserved embryos from the same cohort ' *Fertil Steril*, 67(2): 296-301.

- Murphy, C. R. (2000) 'Understanding the apical surface markers of uterine receptivity: pinopods-or uterodomes?', *Hum Reprod*, 15(12): 2451-4.
- Murray, M. J., Meyer, W. R., Zaino, R. J., Lessey, B. A., Novotny, D. B., Ireland, K., Zeng, D. and Fritz, M. A. (2004) 'A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women', *Fertil Steril*, 81(5): 1333-43.
- Muttukrishna, S., Sharma, S., Barlow, D.H., Ledger, W., Groome, N. and Sathanandan, M. (2002) 'Serum inhibins, estradiol, progesterone and FSH in surgical menopause: a demonstration of ovarian pituitary feedback loop in women' *Hum Reprod*, 17(10): 2535-2539.
- Nardo, L. G., Sabatini, L., Rai, R. and Nardo, F. (2002) 'Pinopode expression during human implantation', *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 101(2): 104-8.
- Nasiri, N. and Eftekhari-Yazdi, P. (2015) 'An overview of the available methods for morphological scoring of pre-implantation embryos in in vitro fertilization', *Cell J*, 16(4): 392-405.
- Nikas, G. (1999) 'Cell-surface morphological events relevant to human implantation', *Hum Reprod*, 14 Suppl 2: 37-44.
- Nimbkar-Joshi, S., Rosario, G., Katkam, R. R., Manjramkar, D. D., Metkari, S. M., Puri, C. P. and Sachdeva, G. (2009) 'Embryo-induced alterations in the molecular phenotype of primate endometrium', *J Reprod Immunol*, 83(1-2): 65-71.
- Noci, I., Borri, P., Coccia, M. E., Criscuoli, L., Scarselli, G., Messeri, G., Paglierani, M., Moncini, D. and Taddei, G. (1997) 'Hormonal patterns, steroid receptors and morphological pictures of endometrium in hyperstimulated IVF cycles', *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 75(2): 215-20.
- Noyes, R. W., Hertig, A. T. and Rock, J. 1950. Dating the endometrial biopsy. *Fertil and Steril*, 1(1): 3-25.
- O'Connell, P. A., Surette, A. P., Liwski, R. S., Svenningsson, P. and Waisman, D. M. (2010) 'S100A10 regulates plasminogen-dependent macrophage invasion', *Blood*, 116(7): 1136-46.
- Ochsenkühn, R., Arzberger, A., von Schönfeldt, V., Gallwas, J., Rogenhofer, N., Crispin, A., Thaler, C. J. and Noss, U. (2012) 'Subtle progesterone rise on the day of human chorionic gonadotropin administration is associated with lower live birth rates in women undergoing assisted reproductive technology: a retrospective study with 2,555 fresh embryo transfers', *Fertil Steril*, 98(2): 347-54.
- Pan, Q. and Chegini, N. (2008) 'MicroRNA signature and regulatory functions in the endometrium during normal and disease states', *Semin Reprod Med*, 26(6): 479-93.
- Papageorgiou, T., Guibert, J., Goffinet, F., Patrat, C., Fulla, Y., Janssens, Y. and Zorn, J. R. (2002) 'Percentile curves of serum estradiol levels during controlled ovarian stimulation in 905 cycles stimulated with recombinant FSH show that high estradiol is not detrimental to IVF outcome', *Hum Reprod*, 17(11): 2846-50.

- Papanikolaou, E. G., Camus, M., Kolibianakis, E. M., Van Landuyt, L., Van Steirteghem, A. and Devroey, P. (2006) 'In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos', *N Engl J Med*, 354(11): 1139-46.
- Papanikolaou, E. G., Kolibianakis, E. M., Pozzobon, C., Tank, P., Tournaye, H., Bourgain, C., Van Steirteghem, A. and Devroey, P. (2009) 'Progesterone rise on the day of human chorionic gonadotropin administration impairs pregnancy outcome in day 3 single-embryo transfer, while has no effect on day 5 single blastocyst transfer', *Fertil Steril*, 91(3): 949-52.
- Parmar, T., Gadkar-Sable, S., Savardekar, L., Katkam, R., Dharma, S., Meherji, P., Puri, C. P. and Sachdeva, G. (2009) 'Protein profiling of human endometrial tissues in the midsecretory and proliferative phases of the menstrual cycle', *Fertil Steril*, 92(3): 1091-103.
- Pawar, S., Laws, M. J., Bagchi, I. C. and Bagchi, M. K. (2015) 'Uterine Epithelial Estrogen Receptor- α Controls Decidualization via a Paracrine Mechanism', *Mol Endocrinol*, 29(9): 1362-74.
- Pawar, S., Starosvetsky, E., Orvis, G. D., Behringer, R. R., Bagchi, I. C. and Bagchi, M. K. (2013) 'STAT3 regulates uterine epithelial remodeling and epithelial-stromal crosstalk during implantation', *Mol Endocrinol*, 27(12): 1996-2012.
- Pellicer, A., Valbuena, D., Cano, F., Remohí, J. and Simón, C. (1996) 'Lower implantation rates in high responders: evidence for an altered endocrine milieu during the preimplantation period', *Fertil Steril*, 65(6): 1190-5.
- Peña, J. E., Chang, P. L., Chan, L. K., Zeitoun, K., Thornton, M. H. and Sauer, M. V. (2002) 'Supraphysiological estradiol levels do not affect oocyte and embryo quality in oocyte donation cycles', *Hum Reprod*, 17(1): 83-7.
- Ponnampalam, A. P. and Rogers, P. A. (2006) 'Cyclic changes and hormonal regulation of annexin IV mRNA and protein in human endometrium', *Mol Hum Reprod*, 12(11): 661-9.
- Ponnampalam, A. P., Weston, G. C., Trajstman, A. C., Susil, B. and Rogers, P. A. (2004) 'Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling', *Mol Hum Reprod*, 10(12): 879-93.
- Poon, W. Y., Malik-Hall, M., Wood, J. N. and Okuse, K. (2004) 'Identification of binding domains in the sodium channel Na(V)1.8 intracellular N-terminal region and annexin II light chain p11', *FEBS Lett*, 558(1-3): 114-8.
- Psychoyos, A. (1986) 'Uterine receptivity for nidation', *Animals of the New York Academy of Science*, 476: 36-46.
- Psychoyos, A. (1973) 'Hormonal control of ovoimplantation' *Vitams Horms*, 31: 201-256.
- Punyadeera, C., Dassen, H., Klomp, J., Dunselman, G., Kamps, R., Dijcks, F., Ederveen, A., de Goeij, A. and Groothuis, P. (2005) 'Oestrogen-modulated gene expression in the human endometrium', *Cell Mol Life Sci*, 62(2): 239-50.

- Quinn, C. E. and Casper, R. F. (2008) 'Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity', *Human Reproduction Update*: 1-7.
- Rai, P., Kota, V., Sundaram, C. S., Deendayal, M. and Shivaji, S. (2010) 'Proteome of human endometrium: Identification of differentially expressed proteins in proliferative and secretory phase endometrium', *Proteomics Clin Appl*, 4(1): 48-59.
- Raziel, A., Friedler, S., Scachter, M., Kasterstein, E., Strassburger, D. and Ron-El, R. (2002) 'Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in-vitro fertilization' *Fertil Steril*, 78(3): 515-19.
- Renigunta, V., Yuan, H., Zuzarte, M., Rinné, S., Koch, A., Wischmeyer, E., Schlichthörl, G., Gao, Y., Karschin, A., Jacob, R., Schwappach, B., Daut, J. and Preisig-Müller, R. (2006) 'The retention factor p11 confers an endoplasmic reticulum-localization signal to the potassium channel TASK-1', *Traffic*, 7(2): 168-81.
- Reuter, K. L., Cohen, S., Furey, L. and Baker, S. (1996) 'Sonographic appearance of the endometrium and ovaries during cycles stimulated with human menopausal gonadotropin', *J Reprod Med*, 41(7): 509-14.
- Riesewijk, A., Martín, J., van Os, R., Horcajadas, J. A., Polman, J., Pellicer, A., Mosselman, S. and Simón, C. (2003) 'Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology', *Mol Hum Reprod*, 9(5): 253-64.
- Roque, M., Valle, M., Guimarães, F., Sampaio, M. and Geber, S. (2015) 'Freeze-all policy: fresh vs. frozen-thawed embryo transfer', *Fertil Steril*, 103(5): 1190-3.
- Saadat, P., Boostanfar, R., Slater, C. C., Tourgeman, D. E., Stanczyk, F. Z. and Paulson, R. J. (2004) 'Accelerated endometrial maturation in the luteal phase of cycles utilizing controlled ovarian hyperstimulation: impact of gonadotropin-releasing hormone agonists versus antagonists', *Fertil Steril*, 82(1): 167-71.
- Sadeu, J. C. and Nogueira, D. (2011) 'Chapitre 1 : Folliculogenesis and oogenesis in vivo and in vitro, in humans females', in Springer-Verlag (ed.) *Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*: 3-21.
- Salamonsen, L. A. (1999) 'Role of proteases in implantation', *Rev Reprod*, 4(1): 11-22.
- Saleh, H. A., Omran, M. S. and Draz, M. (2009) 'Does subtle progesterone rise on the day of HCG affect pregnancy rate in long agonist ICSI cycle' *J Assist Reprod Genet*, 26(5): 239-42.
- Saleh, L., Otti, G. R., Fiala, C., Pollheimer, J. and Knöfler, M. (2011) 'Evaluation of human first trimester decidual and telomerase-transformed endometrial stromal cells as model systems of in vitro decidualization', *Reprod Biol Endocrinol*, 9: 155.

- Salker, M., Teklenburg, G., Molokhia, M., Lavery, S., Trew, G., Aojanepong, T., Mardon, H. J., Lokugamage, A. U., Rai, R., Landles, C., Roelen, B. A., Quenby, S., Kuijk, E. W., Kavelaars, A., Heijnen, C. J., Regan, L., Macklon, N. S. and Brosens, J. J. (2010) 'Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss', *PLoS One*, 5(4): e10287.
- Sandalinas, M., Sadowy, S., Alikani, M., Calderon, G., Cohen, J. and Munné, S. (2001) 'Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage', *Hum Reprod*, 16(9): 1954-8.
- Santi, A., Felser, R. S., Mueller, M. D., Wunder, D. M., McKinnon, B. and Bersinger, N. A. (2011) 'Increased endometrial placenta growth factor (PLGF) gene expression in women with successful implantation', *Fertil Steril*, 96(3): 663-8.
- Santos-Ribeiro, S., Polyzos, N.P., Haentjens, P., Smits, J., Camus, M., Tournaye, H. and Blockeel, C. (2014) 'Live birth rates after IVF are reduced by both low and high progesterone levels on the day of human chorionic gonadotrophin administration' *Hum Reprod*, 29(8):1698-705.
- Sayeed, S., Asano, E., Ito, S., Ohno, K., Hamaguchi, M. and Senga, T. (2013) 'S100A10 is required for the organization of actin stress fibers and promotion of cell spreading', *Mol Cell Biochem*, 374(1-2): 105-11.
- Schumann, S., Buck, V. U., Classen-Linka, I., Wennemuth, G. and Grümmer, R. (2015) 'Claudin-3, claudin-7, and claudin-10 show different distribution patterns during decidualization and trophoblast invasion in mouse and human', *Histochem Cell Biol*.
- Seval, Y., Akkoyunlu, G., Demir, R. and Asar, M. (2004) 'Distribution patterns of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy', *Acta Histochem*, 106(5): 353-62.
- Shih, I., Wang, T., Wu, T., Kurman, R. J. and Gearhart, J. D. (1998) 'Expression of Mel-CAM in implantation site intermediate trophoblastic cell line, IST-1, limits its migration on uterine smooth muscle cells', *J Cell Sci*, 111 (Pt 17): 2655-64.
- Sifer, C. (2014) '[Contribution of embryo vitrification procedure to ART efficiency]', *Gynecol Obstet Fertil*, 42(10): 721-4.
- Simón, C., Oberyé, J., Bellver, J., Vidal, C., Bosch, E., Horcajadas, J. A., Murphy, C., Adams, S., Riesewijk, A., Mannaerts, B. and Pellicer, A. (2005) 'Similar endometrial development in oocyte donors treated with either high- or standard-dose GnRH antagonist compared to treatment with a GnRH agonist or in natural cycles', *Hum Reprod*, 20(12): 3318-27.
- Simón, C., Cano, F., Valbuena, D., Remohí, J. and Pellicer, A. (1995) 'Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients', *Hum Reprod*, 10(9): 2432-7.

- Simón, C., Mercader, A., Gimeno, M. J. and Pellicer, A. (1997) 'The interleukin-1 system and human implantation', *Am J Reprod Immunol*, 37(1): 64-72.
- Simón, C., Moreno, C., Remohí, J. and Pellicer, A. (1998) 'Molecular interactions between embryo and uterus in the adhesion phase of human implantation', *Hum Reprod*, 13 Suppl 3: 219-32;
- Singh, O. V. and Nagaraj, N. S. (2006) 'Transcriptomics, proteomics and interactomics: unique approaches to track the insights of bioremediation', *Brief Funct Genomic Proteomic*, 4(4): 355-62.
- Spitzer, T. L., Rojas, A., Zelenko, Z., Aghajanova, L., Erikson, D. W., Barragan, F., Meyer, M., Tamaresis, J. S., Hamilton, A. E., Irwin, J. C. and Giudice, L. C. (2012) 'Perivascular human endometrial mesenchymal stem cells express pathways relevant to self-renewal, lineage specification, and functional phenotype', *Biol Reprod*, 86(2): 58.
- Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Köntgen, F. and Abbondanzo, S. J. (1992) 'Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor', *Nature*, 359(6390): 76-9.
- Sun, X. Y., Li, F. X., Li, J., Tan, Y. F., Piao, Y. S., Tang, S. and Wang, Y. L. (2004) 'Determination of genes involved in the early process of embryonic implantation in rhesus monkey (*Macaca mulatta*) by suppression subtractive hybridization', *Biol Reprod*, 70(5): 1365-73.
- Svenningsson, P., Chergui, K., Rachleff, I., Flajolet, M., Zhang, X., El Yacoubi, M., Vaugeois, J. M., Nomikos, G. G. and Greengard, P. (2006) 'Alterations in 5-HT_{1B} receptor function by p11 in depression-like states', *Science*, 311(5757): 77-80.
- Tabibzadeh, S. and Babaknia, A. (1995) 'The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion', *Hum Reprod*, 10(6): 1579-602.
- Talbi, S., Hamilton, A. E., Vo, K. C., Tulac, S., Overgaard, M. T., Dosiou, C., Le Shay, N., Nezhat, C. N., Kempson, R., Lessey, B. A., Nayak, N. R. and Giudice, L. C. (2006) 'Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women', *Endocrinology*, 147(3): 1097-121.
- Tanaka, M., Ichikawa-Tomikawa, N., Shishito, N., Nishiura, K., Miura, T., Hozumi, A., Chiba, H., Yoshida, S., Ohtake, T. and Sugino, T. (2015) 'Co-expression of S100A14 and S100A16 correlates with a poor prognosis in human breast cancer and promotes cancer cell invasion', *BMC Cancer*, 15: 53.
- Tapia, A., Gangi, L. M., Zegers-Hochschild, F., Balmaceda, J., Pommer, R., Trejo, L., Pacheco, I. M., Salvatierra, A. M., Henríquez, S., Quezada, M., Vargas, M., Ríos, M., Munroe, D. J., Croxatto, H. B. and Velasquez, L. (2008) 'Differences in the endometrial transcript profile during the receptive period between women who were refractory to implantation and those who achieved pregnancy', *Hum Reprod*, 23(2): 340-51.
- Tarlatzis, B.C., Toncheva, D.I. and Vatev, I.T. (2000) 'Significance of chromosomal aberrations for the unsuccessful procedures of assisted reproduction' *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 88(2): 181-7.

- Teklenburg, G. and Macklon, N. S. (2009) 'Review: in vitro models for the study of early human embryo-endometrium interactions', *Reprod Sci*, 16(9): 811-8.
- Telgmann, R., Maronde, E., Taskén, K. and Gellersen, B. (1997) 'Activated protein kinase A is required for differentiation-dependent transcription of the decidual prolactin gene in human endometrial stromal cells', *Endocrinology*, 138(3): 929-37.
- Tortora, G. J. and Derrickson, B. (2007) *Principes d'anatomie et de physiologie*. De Boeck, Bruxelles, 1376 p.
- Trévoux, R. (2009) *L'endomètre - Présent et avenir*. John Libbey, France, 426 p.
- Ulbrich, S. E., Groebner, A. E. and Bauersachs, S. (2013) 'Transcriptional profiling to address molecular determinants of endometrial receptivity--lessons from studies in livestock species', *Methods*, 59(1): 108-15.
- Umbrecht-Jenck, E., Demais, V., Calco, V., Bailly, Y., Bader, M. F. and Chasserot-Golaz, S. (2010) 'S100A10-mediated translocation of annexin-A2 to SNARE proteins in adrenergic chromaffin cells undergoing exocytosis', *Traffic*, 11(7): 958-71.
- Van der Linden, M., Buckingham, K., Farquhar, C., Kremer, J. A. and Metwally, M. (2011) 'Luteal phase support for assisted reproduction cycles' *Cochrane Database Syst Rev* : CD009154.
- Venetis, C. A., Kolibianakis, E. M., Papanikolaou, E., Bontis, J., Devroey, P. and Tarlatzis, B. C. (2007) 'Is progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotrophin administration associated with the probability of pregnancy in in vitro fertilization? A systematic review and meta-analysis', *Hum Reprod Update*, 13(4): 343-55.
- Voullaire, L., Wilton, L., McBain, J., Callaghan, T. and Williamson, R. (2002) 'Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure', *Mol Hum Reprod*, 8(11): 1035-41.
- Walpita, D. and Hay, E. (2002) 'Studying actin-dependent processes in tissue culture', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(2): 137-41.
- Weenen, C., Laven, J.S., Von Bergh, A. R., Cranfield, M., Groome, N.P., Visser, J.A., Kramer, P., Fauser, B.C. and Themmen, A.P. (2004) 'Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment', *Mol Hum Reprod*, 10(2): 77-83.
- Wei, X., Tong, S. and Yan, Q. (2014) '[Cyclic changes of S100A10 expression in human endometrium]', *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 94(27): 2152-5.
- Wilcox, A. J., Baird, D. D. and Weinberg, C. R. (1999) 'Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy', *N Engl J Med*, 340(23): 1796-9.
- Yanaihara, A., Otsuka, Y., Iwasaki, S., Aida, T., Tachikawa, T., Irie, T. and Okai, T. (2005) 'Differences in gene expression in the proliferative human endometrium', *Fertil Steril*, 83 Suppl 1: 1206-15.

- Zhang, J., Chen, Z., Smith, G. N. and Croy, B. A. (2011) 'Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth?', *Cell Mol Immunol*, 8(1): 1-11.
- Zobiack, N., Gerke, V. and Rescher, U. (2001) 'Complex formation and submembranous localization of annexin 2 and S100A10 in live HepG2 cells', *FEBS Lett*, 500(3): 137-40.

Annexe

Abréviations

ADN	Acides désoxyribonucléiques
Allt	Complexe annexine A2-S100A10
AMH	Hormone anti-müllérienne
AMP	Assistance médicale à la procréation
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANX	Annexine
ARN	Acides ribonucléiques
ARNm	ARN messenger
Ca ²⁺	Ion de calcium
DPI	Diagnostic pré-implantatoire
ERA	Endometrial receptivity array
FIV	Fécondation <i>in vitro</i>
FSH	Hormone folliculostimulante
GnRH	Gonadolibérine
hCG	Hormone chorionique gonadotrope humaine
ICSI	Injection cytoplasmique de spermatozoïde
IL	Interleukine
kDa	Kilodalton
LH	Hormone lutéinisante
LIF	Leukemia inhibitory factor
MCI	Masse cellulaire interne
MEC	Matrice extracellulaire

MMPs	Métalloprotéinases matricielles
qPCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitatif
RT-PCR	Transcription inverse - Réaction en chaîne par polymérase
shRNA	Petits ARN en épingle à cheveux
SPP1	Secreted phosphoprotein 1
Th	Lymphocytes T auxiliaire (T helper)
THS	Traitement hormonal substitutif
TIMP	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
TNF	Facteur de nécrose tumorale
tPA	Activateur tissulaire du plasminogène
TWEAK	Tumor necrosis factor weak inducor of apoptosis
uNK	Cellules natural killer utérines
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
Win-Test	Window Implantation Test