



Stimuler plus, stimuler
moins ?

Effet de la stimulation sur
la qualité ovocytaire.

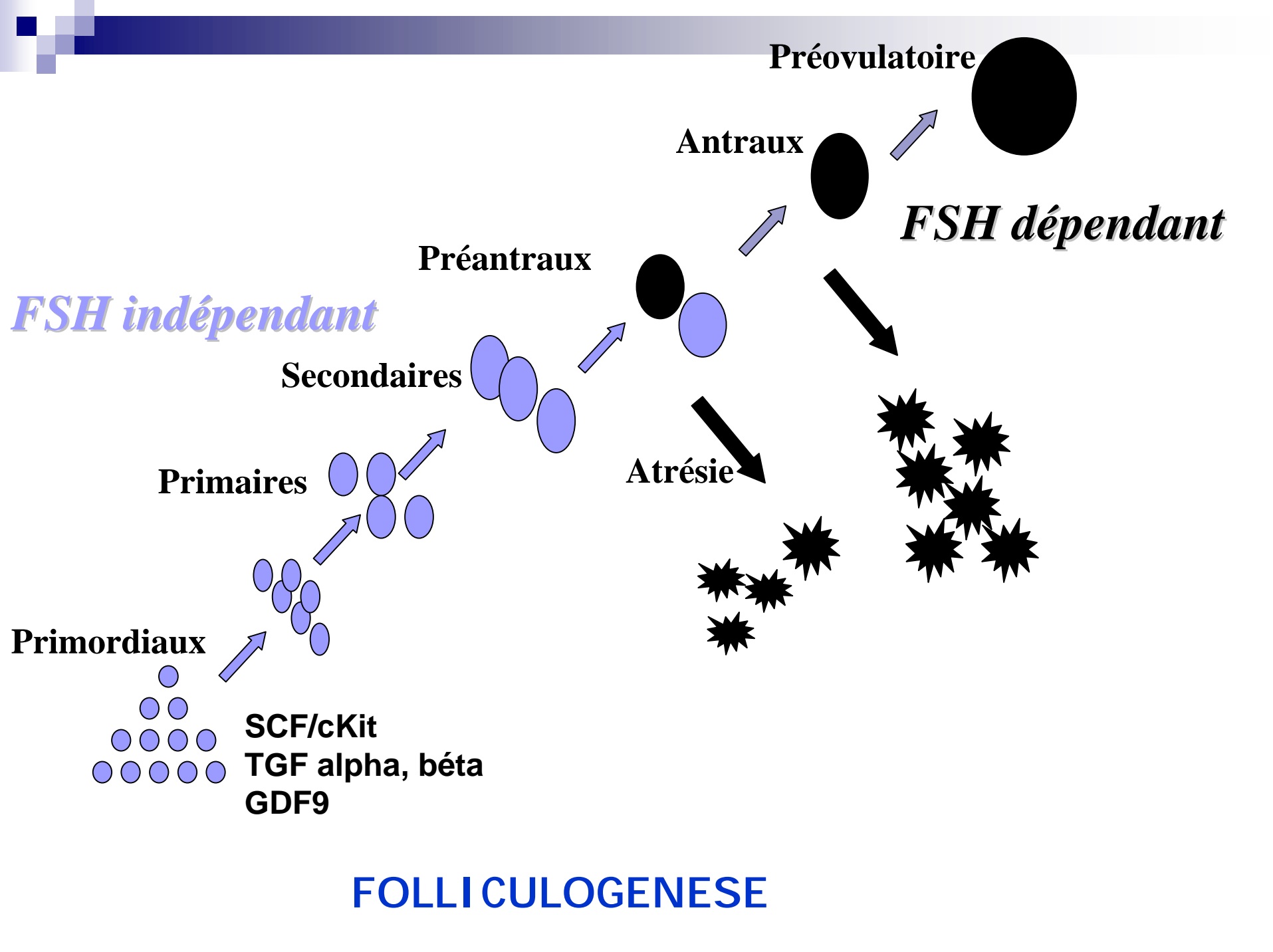
FFER 2007

Dr Patrice CLEMENT

Département génétique et reproduction

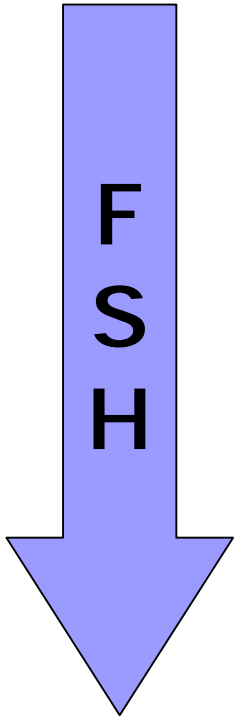
Laboratoire CLEMENT

93150 LE BLANC MESNIL



Follicules

Stade pré-antral



Ovocyte bloqué en fin de prophase méiotique

Acquisition de :

- compétence à reprise de méiose
- assurer fécondation
- assurer développement précoce

Stade ovulatoire

Ovocyte bloqué en métaphase II

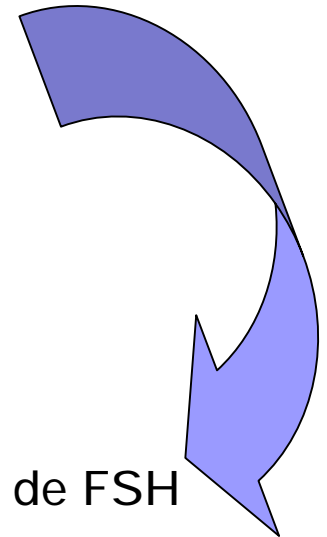
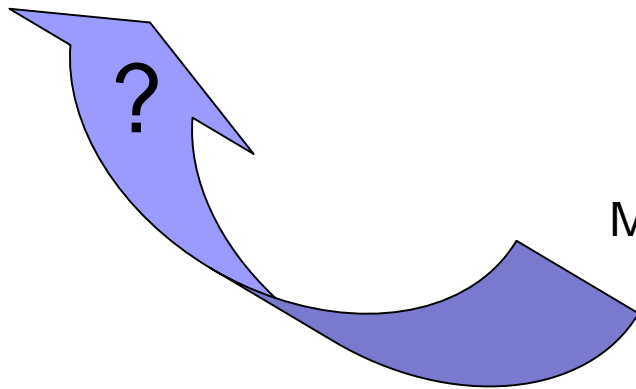
Relation étroite entre follicule et ovocyte : régulation paracrine et autocrine.
Albertini DF et al, RBM Online 2003

Compétences de l'ovocyte acquises à partir du stade antral :

- Modification structure de la chromatine
- Polyadénylation et traduction des ARNm
- Empreinte parentale
- Production GSH
- Phosphorylation des centrosomes
- Réarrangement des microtubules
- Compétence à la reprise de méiose
- Capacité aux oscillations calciques
- ...

Action FSH
sur le follicule

Modification de la quantité de FSH
(Stimulation)



Qualité ovocytaire ???

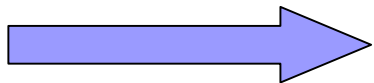
- Morphologique.
- Aptitude à être fécondé et à un développement embryonnaire permettant une grossesse évolutive.

L'ovocyte idéal



- Forme ronde
- Cytoplasme clair homogène et réfringent
- Globule polaire intact rond ou légèrement ovale
- EPV réduit et sans débris
- Zone pellucide claire

Etude multicentrique : 1900 ovocytes analysés, 18 paramètres morphologiques.



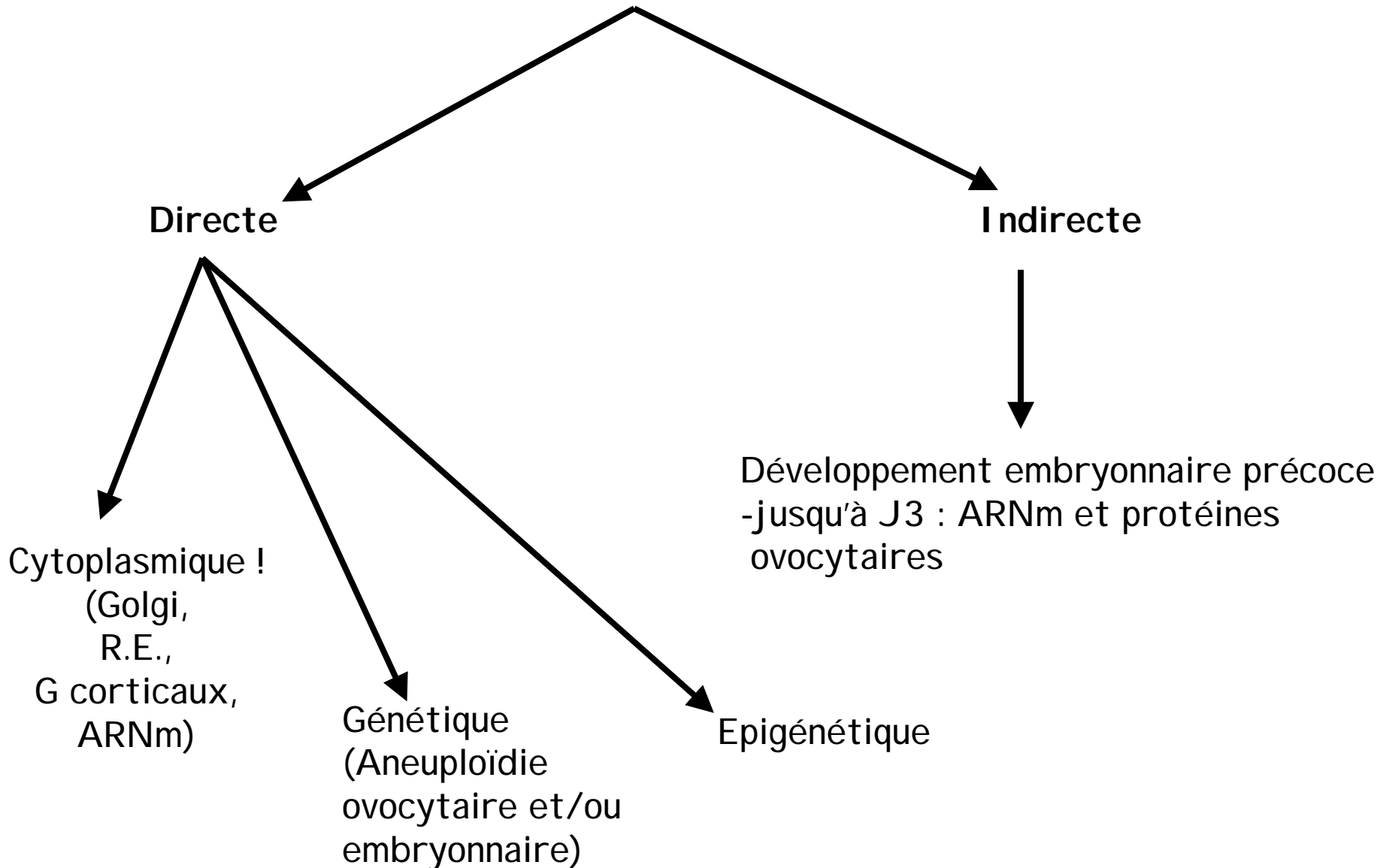
Selon les équipes : 5 à 60% d'ovocytes idéaux !

Morphologie ovocytaire

- Evaluation subjective (sauf vacuoles)
- N'évalue pas les données cytoplasmiques moléculaires, génétiques et épigénétiques.
- Polscope : caractéristiques du fuseau comme critère de qualité ovocytaire.

Rama Raju GA, et al; Hum Reprod, 2007

Evaluation de la qualité moléculaire de l'ovocyte



Aneuploïdie embryonnaire

(Baart et al, 2007)

111 patientes (<38 ans, bilan J3 favorable), conjoint num Spz>5M/ml

Randomisation

Groupe agoniste GnRH
(stimulation protocole long)

Groupe antagoniste
(stimulation « douce »)

FISH sur embryons
(1,7,13,15,16,18,21,22,X,Y)

61 E : analyse d'une cellule
98 E : analyse de 2 cellules

47 E : analyse d'une cellule
96 E : analyse de 2 cellules

Pas de différence de profil entre les deux groupes de patientes

Aneuploïdie embryonnaire

(Baart et al, 2007)

	Stimulation conventionnelle	« Mild » stimulation	p
Nb patientes	40	55	
Ovo obtenus	12,1 +/- 5,7	8,3 +/- 4,7	<0,01
Tx fécondation	57 +/- 28	55 +/- 30	0,8
Embryons	6,8 +/- 5	4,7 +/- 3,9	0,03

Aneuploïdie embryonnaire

(Baart et al, 2007)

	Stimulation conventionnelle	« Mild » stimulation	p
<u>Examen sur 1 cellule embr</u>	98 embryons	96 embryons	
Embryons aneuploïdes (%)	63%	45%	0,016
<u>Examen sur 2 cellules embr</u>	61 embryons	47 embryons	
Embryons aneuploïdes (%)	73%	55%	0,046
Embryons mosaïques (%)	65%	37%	0,004

Aneuploïdie embryonnaire

(Baart et al, 2007)

- « Mild » stimulation : moins d'ovocytes, moins d'embryons au total, mais autant d'embryons euploïdes.
- Nb total d'embryons : pas un critère de qualité
- Groupe « mild » :

nb embryons totaux ↘ → nb embryons aneuploïdes ↘

Aneuploïdie embryonnaire

(Baart et al, 2007)

Aneuploïdie de l'embryon : asynchronisme de maturation cytoplasmique

Utilisation des ARNm et protéines de l'ovocyte fécondé

Fin de méiose (ovocyte)

Aneuploïdie homogène

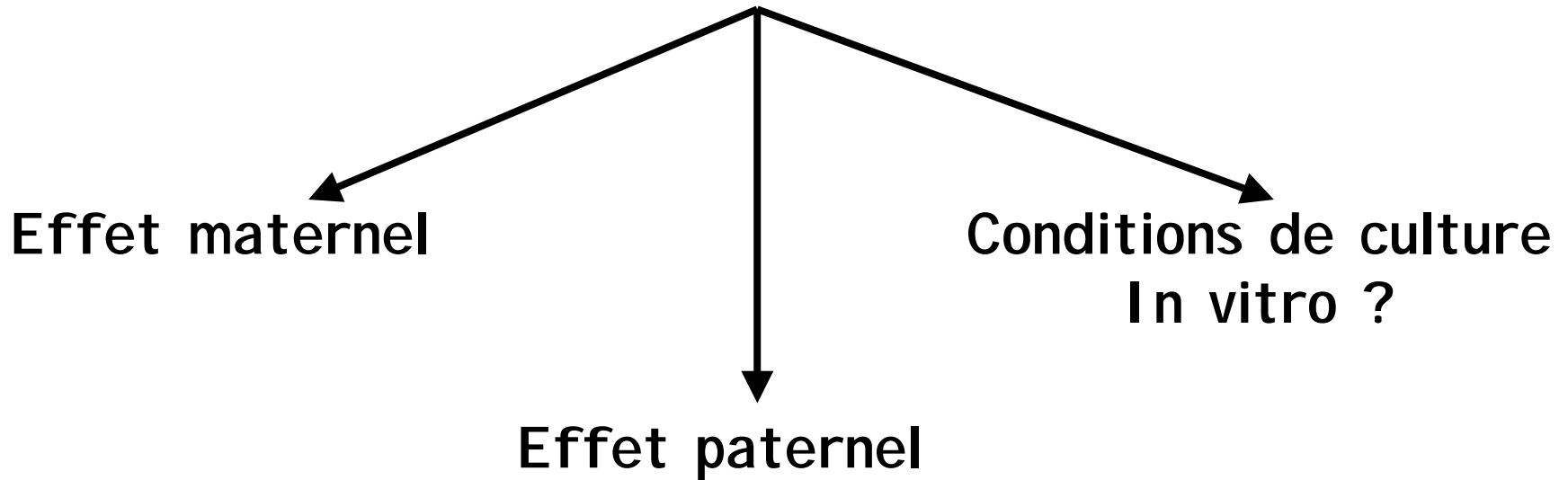
Première mitose de l'embryon (J3)

Aneuploïdie en mosaïque

Exemple protéine SYCP3 (souris)
(Lighfoot DA et al, 2006)

Baart : stimulation protocole long entraîne le recrutement de follicules avec des ovocytes trop immature sur le plan moléculaire

Aneuploidie embryonnaire



Menezo et al, RBM, 2006

Difficile de lier l'aneuploidie embryonnaire uniquement à une cause ovocytaire

Aneuploidie ovocytaire

- Cause importante d'anomalie chromosomique des fœtus (Boué et al, 1975)
- Corrélié avec l'âge de la patiente.
- Asynchronisme de maturation entre cytoplasme et noyau (Battaglia et al, 1997)
- Influence de la stimulation ?

Aneuploidie ovocytaire et stimulation de l'ovulation

Etudes discordantes : modèles animaux

- Absence de différence de non disjonction avec ou sans stimulation (souris)
 - Hansmann I et al, Cell Genet, 1979
 - Golbus M et al, Cell Genet, 1981
- Augmentation des non disjonctions en cas de stimulation ovarienne
 - Vogel R et al, Reprod Toxicol., 1992
 - McKiernan S et al, HR, 1998
 - Hodges C.A. et al, HR, 2001
- Quel mécanisme ? Rôle de la FSH ?

FSH et aneuploïdie

Modèles animaux

- FSH a une action sur la configuration du fuseau méiotique

Rossi G et al, Hum Reprod, 2006

- Augmentation du taux de FSH modifie l'alignement des chromosomes et augmente le risque d'aneuploïdie de l'ovocyte.

Roberts R et al, Biol Reprod, 2005

- Stimulations répétées par FSH altèrent la qualité du fuseau méiotique

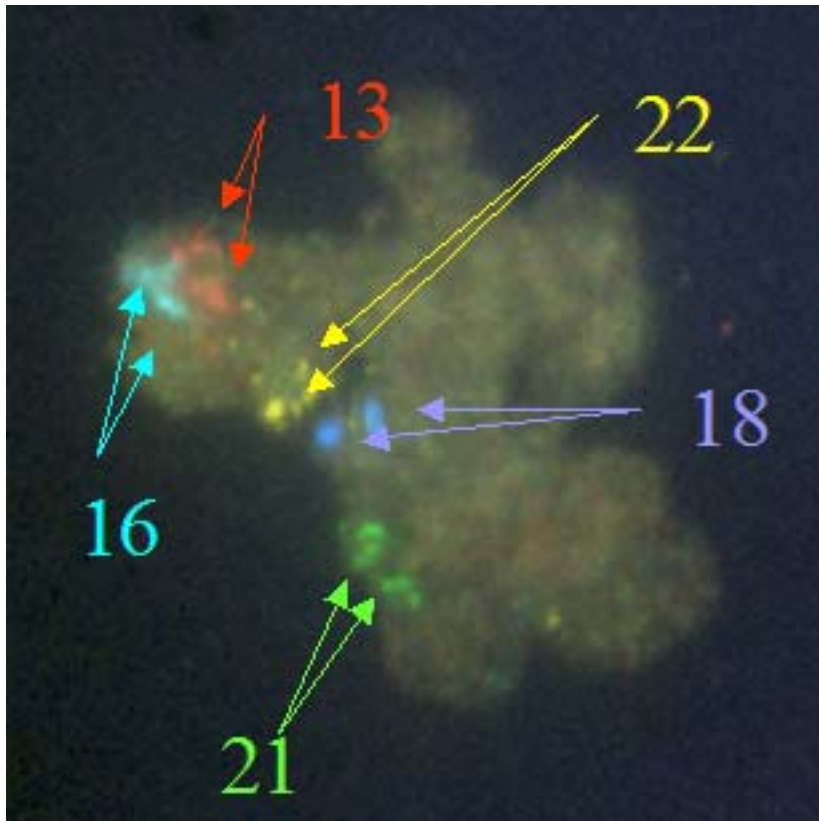
Van Blerkom et al, Hum Reprod, 2001

FSH et aneuploïdie

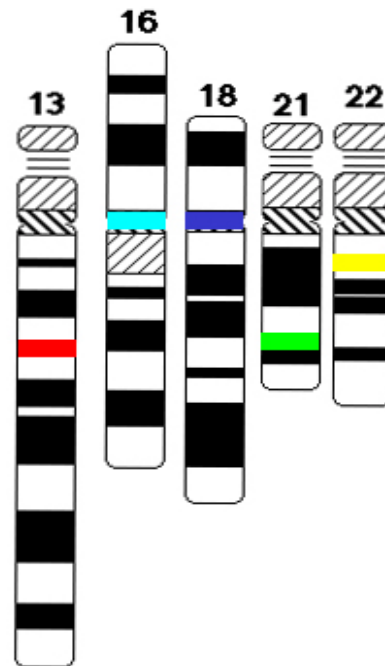
Hammoud I et al, Poster ASRM, 2007

Dans le cadre du Diagnostic Pré Conceptionnel (biopsie 1^{er} GP) :

- Analyse de l'aneuploïdie du 1^{er} GP (67 patientes)
- Analyse de chaque fluide folliculaire (370) : dosage FSH, LH, Pg, E2, AMH.



Hybridation in situ sur 1^{er} GP.
Sondes 13, 16, 18, 21 et 22

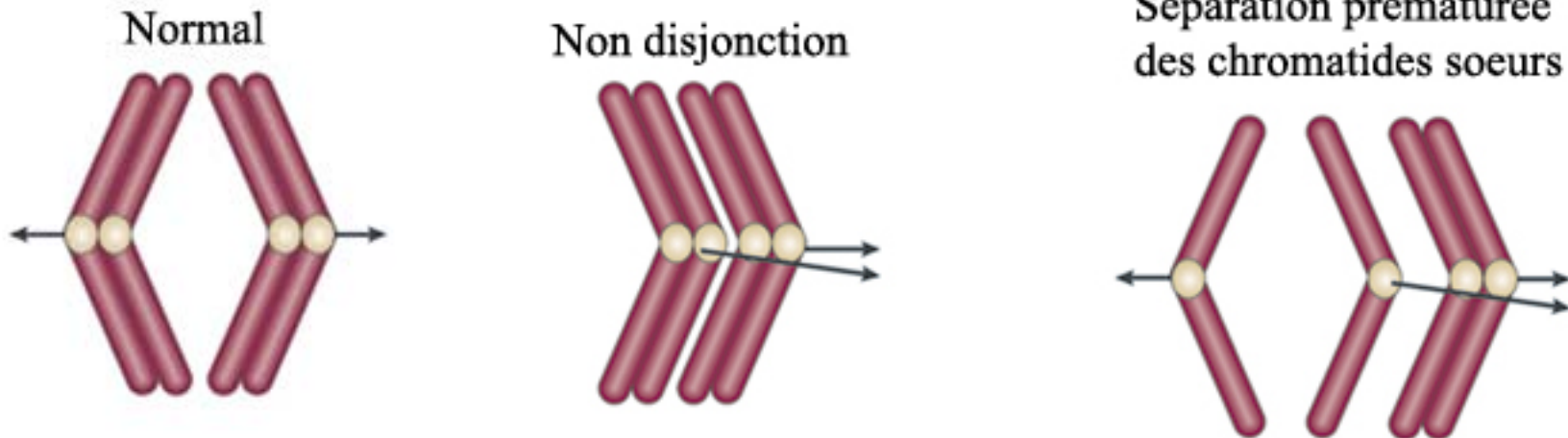


FSH et aneuploïdie

Hammoud I et al, 2007

FSH seul marqueur corrélé avec l'aneuploïdie de l'ovocyte.
Augmentation FSH est corrélée avec le nombre d'anomalies chromosomiques

Mécanisme principal : séparation prématurée des chromatides sœur (ayant lieu normalement à la fin de la méiose ovocytaire avec expulsion du 2ème GP)



Questions :

- Action directe ou non de la FSH sur l'aneuploïdie ?
- Population de femmes > 36 ans et/ou échecs d'implantation.

Facteurs épigénétiques

AMP et maladies d'empreinte ?

Syndrome de Wiedemann-Beckwith:

Gicquel et al. Am J Hum Genet; 2003 ; 72:1338

DeBaun et al. Am J Hum Genet; 2003 ; 72:156

Maher et al. J Med Genet; 2003; 40:62

Déméthylation du gène maternel KCNQ10T

Syndrome d'Angelman:

Cox et al. Am J Hum Genet 2002; 71: 162

Orstavik et al. Am J Hum Genet 2003; 72: 218

Déméthylation du gène maternel SNRPN

Large Offspring Syndrome

Young et al. Nature 2001; 27: 153

Déméthylation du locus maternel DMR2 du gène IGF2R

Mécanisme d'empreinte parentale : méthylation différentielle ADN (maternel/paternel). Modification importante pendant la gamétogenèse.

Cinétiques de mise en place de l'empreinte génomique très différentes entre gamétogenèse masculine et féminine.

Relation entre maladie d'empreinte et AMP ?
Mécanisme ? Influence de la stimulation ?

Empreinte génomique profondément modifiée pendant ovogenèse au stade du follicule antral : gènes IGF2, SNRPN, PEG1, PEG2

Lucifero D et al, Hum Mol Genet, 2004

Influence d'une super ovulation sur les mécanismes d'empreinte ?

Lucifero D et al, Hum Reprod Update, 2004

Stimulation ovarienne : modification de l'empreinte génomique

Sato A et al, Hum Reprod, 2007

Analyses de gènes soumis à empreinte :

- 3 gènes soumis à empreinte maternelle : PEG1, LIT1, ZAC
- 1 gène soumis à empreinte paternelle : H19

Examens effectués (étude de méthylation des gènes) :

- dans l'ovaire néonatal de souris
- dans l'ovaire adulte (souris et femme) : non stimulés et stimulés.

Comparaison ovocytes stimulés / ovocytes non stimulés :

- Gain de méthylation de H19
- Perte de méthylation de PEG1

Stimulation ovarienne : modification de l'empreinte génomique

Sato A et al, Hum Reprod, 2007

Conclusion : modification du profil de méthylation par la stimulation

Questions :

- Y-a-t-il une conséquence de cette modification de profil sur une maladie d'empreinte ?
- La modification est elle directement liée à la stimulation ?
- Le profil de méthylation est il lié à l'âge des patientes ?
- Le profil de méthylation n'est il pas la cause de l'infertilité ?

Conclusions

- Une stimulation ovarienne forte semble augmenter le taux d'aneuploidie des ovocytes et des embryons obtenus.
- Le nombre total d'embryons n'est pas un critère de qualité d'une tentative.
- Le nombre d'embryons euploïdes est un critère qui doit être retenu
- Il est possible que la stimulation modifie le profil de méthylation des ovocytes.