



## L'implantation : premier dialogue entre la mère et l'embryon

D'après la communication de S. Perrier d'Hauterive

Centre d'Immunologie, Université de Liège, Belgique.

### RÉSUMÉ

Malgré des progrès constants dans l'assistance médicale à la procréation, le manque de connaissances et de contrôle du processus implantatoire demeure un important facteur d'échec de grossesse. Il est important de chercher à déterminer les caractéristiques d'un endomètre réceptif.

L'implantation embryonnaire est un processus complexe au cours duquel l'embryon va d'abord s'apposer, puis adhérer à l'endomètre maternel pour ensuite y pénétrer.

Alors que l'implantation peut se faire dans n'importe quel tissu de l'organisme, l'endomètre n'est favorable à l'implantation embryonnaire que pendant une période limitée appelée "fenêtre implantatoire".

L'existence d'un dialogue materno-fœtal est indispensable pendant cette période. Il reste encore à identifier les signaux prédominants de ce dialogue et à définir les caractéristiques d'un endomètre réceptif.

Dans ce cadre, le Professeur V. Geenen et le Docteur S. Perrier d'Hauterive, du Centre d'Immunologie de Liège, explorent le rôle de l'hormone chorionique gonadotrope (hCG), du *Transforming Growth Factor*  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1), des insuline-like growth factors 1 et 2 (IGF1 et IGF2) dans la régulation de la sécrétion du LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) et d'IL6 (interleukine 6) par l'épithélium endométrial humain en culture.

Des cultures primaires de cellules épithéliales d'endomètre humain ont été réalisées à partir de biopsies d'endomètre réalisées chez 28 patientes fertiles.

Les cellules épithéliales ont été mises en culture pendant 72 h et elles ont été exposées à des facteurs embryonnaires exprimés précocement tels que l'IGF1, l'IGF2, l'hCG et le TGF $\beta$ 1.

hCG, TGF $\beta$ 1, IGF1 et IGF2 stimulent la production endométriale de LIF *in vitro*. Par ailleurs, l'hCG et le TGF $\beta$ 1 réduisent la production endométriale d'IL6 *in vitro*.

Ainsi, ces données suggèrent que des signaux précoces du blastocyste tels que hCG et TGF $\beta$ 1 joueraient un rôle actif dans l'implantation et dans la tolérance maternelle.

### SUMMARY: Implantation: the first maternal-embryo crosstalk.

Despite progress in assisted reproduction technologies, the lack of control of implantation remains a major obstacle to obtain successful pregnancies. It is of prime importance to determine the characteristic features of a receptive endometrium. Embryo implantation is a complex event involving apposition followed by the adhesion of the blastocyst to the maternal endometrium, and finally the invasion of this endometrium. Though implantation could occur in any human tissue, the endometrium is the only tissue where embryo implantation cannot occur except during a restricted period called the "implantation window". During this window, the endometrium is highly receptive to the embryo. Maternal-embryo crosstalk is favored by the implantation window. The molecular basis of the implantation window remains to be defined. In the present study, we investigated the role of hCG, TGF $\beta$ 1, IGF1 and IGF2 in the secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6) by human epithelial endometrial cells in culture. Epithelial endometrial cells were obtained from endometrial biopsy in 28 fertile women.

hCG and TGF $\beta$ 1 added to primary cultures of human epithelial endometrial cells showed a stimulatory effect on LIF secretion and a reducing effect on IL-6 secretion.

All these findings suggest a role for hCG and TGF $\beta$ 1 in human embryo implantation.

L'implantation embryonnaire est un processus complexe au cours duquel l'embryon va d'abord s'apposer, puis adhérer à l'endomètre maternel pour ensuite y pénétrer. Le succès de l'implantation nécessite tout d'abord des interactions synchronisées entre l'em-

bryon et l'endomètre maternel. On comprend dès lors l'importance d'un dialogue au niveau de cet interface materno-fœtal. Ce dialogue va s'établir par l'intermédiaire de différentes molécules d'adhésion, de facteurs de croissance, de chimiokines et de cytokines.

## ■ NOTION DE FENÊTRE D'IMPLANTATION

Un des protagonistes de ce dialogue materno-fœtal est l'endomètre.

Sous l'effet de l'œstrogène et de la progestérone, il va subir des modifications structurales et moléculaires le rendant réceptif à l'implantation embryonnaire.

En effet, alors que l'embryon peut s'implanter n'importe quand dans beaucoup de tissus du corps humain, l'endomètre est un tissu dans lequel l'embryon ne peut s'implanter que dans une période limitée appelée "fenêtre implantatoire".

Chez une femme présentant des cycles de 28 jours, cette fenêtre implantatoire s'étend du 20<sup>e</sup> au 24<sup>e</sup> jour du cycle.

## ■ MARQUEURS DE LA FENÊTRE D'IMPLANTATION

Il n'existe pas une définition moléculaire précise de la fenêtre d'implantation, cependant, plusieurs marqueurs de réceptivité ont été proposés.

### Les pinopodes

Parmi les marqueurs endométriaux, on retrouve les pinopodes. Il s'agit de protrusions apicales au niveau des cellules épithéliales de l'endomètre. Ces pinopodes apparaissent le 19<sup>e</sup> jour du cycle et disparaissent le 21<sup>e</sup> jour.

Ils semblent jouer un rôle dans les phénomènes de transduction au niveau de l'endomètre et dans les échanges de protéines de bas poids moléculaire.

### Les intégrines

Les intégrines sont d'autres marqueurs de cette fenêtre implantatoire, et plus particulièrement l' $\alpha 1\beta 1$ , l' $\alpha 4\beta 1$  et l' $\alpha 5\beta 3$ , qui sont toutes les trois sous la dépendance de la progestérone. Ces intégrines sont simultanément présentes pendant la fenêtre implantatoire. On a pu observer que des modifications de leur profil d'expression s'accompagnaient d'une réduction de réceptivité au niveau de l'endomètre.

### Les mucines

Les mucines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire qui interviennent dans la formation du glycocalix à la surface de l'épithélium. Chez la souris, on a montré que MUC-1 a une action anti-implantatoire, bien que son rôle chez la femme soit plus discuté, il semblerait que MUC-1 agisse bien

comme molécule d'anti-adhésion que seuls les embryons "compétents" sont capables de cliver pour pouvoir s'implanter.

## ■ CYTOKINES DE L'IMPLANTATION

### Cytokines Th1 et Th2

Les cytokines et les facteurs de croissance sont d'importants médiateurs dans le dialogue materno-fœtal. L'endomètre et l'embryon sont eux-mêmes d'importants sites de production de ces cytokines. Au moment de l'implantation, l'endomètre se trouve donc dans un environnement très riche en diverses cytokines.

Classiquement, on distingue 2 groupes de cytokines en fonction de la polarisation de sécrétion des lymphocytes T "helper" ou "auxiliaires" : les cytokines du groupe Th1 et celles du groupe Th2.

Les cytokines de type Th1 (IL2, TNF $\beta$  et IFN $\gamma$ ) interviennent dans les réactions immunitaires à médiation cellulaire. Elles seraient délétères pour l'implantation.

Les cytokines du groupe Th2 interviennent dans les réactions immunitaires à médiation humorale et seraient favorables à l'implantation. Parmi ces cytokines Th2, on retrouve l'interleukine 4 et l'interleukine 5 (IL4 et IL5) et le ligand du CD40 (CD40L).

L'IL10 et le TGF $\beta$  avaient été initialement classés dans le groupe des Th2, mais, actuellement, il semblerait qu'elles soient plutôt produites par des cellules T dites "régulatrices".

Jusqu'à très récemment, il était communément admis qu'une grossesse normalement évolutive se déroulait dans un environnement de type Th2, tandis qu'une tendance cytokinique Th1 se rencontrait plus souvent chez des patientes faisant des avortements à répétition.

Cependant, les études actuelles ont tendance à bouleverser ce paradigme, notamment des études d'inactivation du gène de l'IFN $\gamma$  chez la souris. Chez ces souris, l'implantation ne se fait pas. Par contre, l'inactivation des gènes de l'IL4 et de l'IL5 chez la souris n'altère pas l'implantation. L'implantation n'est donc pas exclusivement un "phénomène Th2", mais nécessite un juste équilibre entre cytokines Th1 et Th2.

### LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*)

À côté des cytokines Th1/Th2, d'autres cytokines ont une importance capitale dans le processus implantatoire. Le chef de file de ces autres cytokines est le *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF). Stewart a mon-

tré que chez les souris invalidées pour le gène du LIF (*Lif*<sup>-/-</sup>), l'implantation ne se réalise pas, alors que l'apport de LIF exogène à ces mêmes souris restaure l'implantation [1, 2].

Le rôle du LIF dans l'implantation humaine est beaucoup moins connu. Ce que l'on sait, c'est que la production de LIF est maximale au moment de la fenêtre d'implantation. D'autre part, l'endomètre et le blastocyste expriment le LIF et les récepteurs du LIF.

De plus, les cultures d'explants de cellules endométriales réalisées chez des patientes infertiles montrent des taux réduits de production de LIF.

En d'autres termes, l'endomètre humain produit du LIF en quantité maximale au moment de l'implantation et le blastocyste est capable de répondre à ce signal. On a ainsi un exemple d'un possible dialogue à l'interface materno-foetal.

### Interleukine 1 (IL1)

Une autre cytokine importante est le système IL1 (IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  et IL1ra). Carlos Simon a démontré que l'administration de IL1ra chez la souris s'accompagne d'un déficit d'implantation [3]. Ces résultats sont toutefois actuellement discutés (et par l'équipe de Simon lui-même). En effet, l'inactivation du gène de l'IL1 chez la souris ne provoque pas de déficit d'implantation.

Quoi qu'il en soit, il est plus que probable que le système IL1 joue un rôle important dans le processus implantatoire. En effet, l'endomètre exprime l'IL1 au moment de l'implantation et les récepteurs de l'IL1 sont retrouvés aussi bien au niveau du placenta, du blastocyste et au niveau de l'endomètre.

### La famille du TGF $\beta$

L'endomètre humain produit les TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3 et TGF $\beta$ 4 de façon maximale au moment de l'implantation. On connaît le rôle du TGF $\beta$ 1 en tant qu'inducteur du mésoderme embryonnaire, mais il semble également jouer un rôle immunorégulateur à l'interface materno-foetal.

### Interleukine 6 (IL6)

Comme chez la souris, l'IL6 semble jouer un rôle important, mais non primordial au moment de l'implantation embryonnaire chez l'homme.

D'autres interleukines comme l'IL18, l'IL15 et l'IL11 jouent également un rôle primordial dans l'implantation.

## TOLÉRANCE IMMUNOLOGIQUE MATERNELLE VIS-À-VIS DE L'ALLOGREFFE FŒTALE

Lors du trajet de la trompe vers l'utérus, l'embryon est entouré de la zone pellucide et il n'y a pas de présentation antigénique à la surface de l'embryon. En revanche, une fois que la zone pellucide se résorbe, les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1b (le HLA-G, notamment) sont exprimées à sa surface.

La molécule HLA-G semble jouer un rôle important dans la tolérance en inhibant les effets cytotoxiques des cellules NK (cellules *Natural Killer* spécifiques de l'endomètre). Ces cellules NK jouent un rôle pivot dans l'implantation. Le HLA-G permet également l'apoptose des cellules T CD8<sup>+</sup> et favoriserait la polarisation Th2.

Ainsi, l'implantation est un processus complexe nécessitant une balance bien régulée entre la production cytokinique, la reconnaissance du conceptus *via* les HLA non classiques (HLA-G notamment) et les cellules NK. Si l'équilibre est respecté, on peut espérer une grossesse évolutive, alors que s'il existe un déséquilibre, tant au niveau cytokinique qu'au niveau de la reconnaissance du conceptus, un rejet de l'allogreffe foetale est probable.

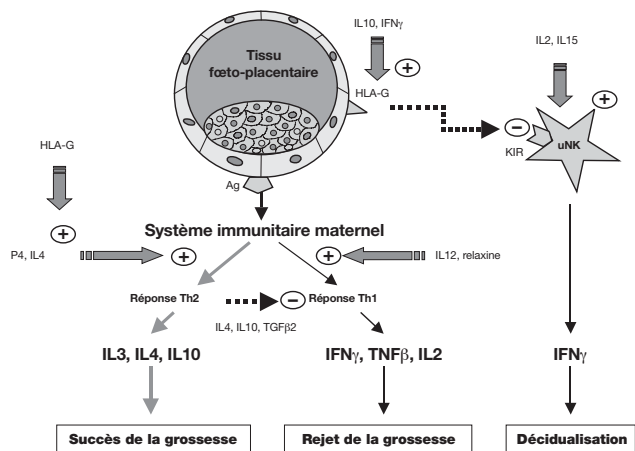


Figure 1 Tolérance immunologique maternelle vis-à-vis de la greffe foetale.

## RÔLE DE L'EMBRYON DANS SON IMPLANTATION : ÉTUDE DU CENTRE D'IMMUNOLOGIE DE LIÈGE

### Matériel et méthode

Le Centre d'Immunologie de Liège a réalisé une étude portant sur 28 patientes fertiles, 14 étant en phase proliférative et 14 en phase sécrétoire.

Des biopsies endométriales ont été réalisées et des cultures primaires de ces cellules épithéliales ont été obtenues en séparant les cellules épithéliales des cellules stromales.

Les cellules épithéliales ont été mises en culture pendant 72 heures et elles ont subi un traitement par des facteurs embryonnaires exprimés précocement tels que l'IGF1, l'IGF2, l'hCG et le TGFβ1.

## Résultats

### *Effet de l'IGF1, IGF2, hCG et TGFβ1 sur la sécrétion de LIF*

Aussi bien en phase proliférative qu'en phase sécrétoire, ils ont observé un effet stimulateur de l'IGF1 sur la production de LIF par les cellules épithéliales. En revanche, ils n'ont observé aucun effet de l'IGF1 sur la production d'IL6.

De façon similaire, ils ont pu observer un effet stimulateur de l'IGF2 sur la production de LIF dans les 2 phases du cycle. IGF2 n'avait pas d'effet sur la production d'IL6.

IGF1 et IGF2 ont donc un même effet stimulateur sur la production endométriale de LIF au cours des 2 phases du cycle.

Ils retrouvent aussi un effet stimulateur de l'hCG sur la production de LIF, et ce dans les 2 phases. Par ailleurs, l'hCG réduit la production d'IL6 au niveau de ces cellules épithéliales endométriales, aussi bien en phase proliférative qu'en phase sécrétoire.

L'adjonction d'un inhibiteur de l'IL1 aux cultures n'enraye en rien l'effet stimulateur de la production de LIF par l'hCG. Ainsi, l'action de l'hCG n'est pas liée à une production locale d'IL1.

Ils ont testé également l'effet du TGFβ1. Là encore, le TGFβ1 stimule la production de LIF de façon dose dépendante en phase proliférative et en phase sécrétoire.

Comme l'hCG, le TGFβ1 réduit la production d'IL6 dans les 2 phases.

### *Expression du récepteur à l'estradiol au niveau des cellules épithéliales*

Par PCR classique, ils ont mis en évidence le transcrit du récepteur de LH/hCG (LH/hCGR) au niveau des cellules épithéliales.

E1 = patiente en phase proliférative.

E2 = patiente en phase sécrétoire.

Le contrôle positif utilisé était des cellules de la granulosa.

Des études sont en cours pour essayer de quantifier l'expression de ce récepteur au cours du cycle.

Il semblerait qu'il existe une modification de l'expression de LH/hCGR entre les 2 phases. Ces résultats sont toutefois des résultats préliminaires nécessitant confirmation sur un nombre plus important de patientes.

L'ensemble de ces résultats a été soumis pour publication [4].

## ■ CONCLUSION

L'implantation est une étape clé dans le processus de reproduction.

L'existence d'un dialogue entre l'épithélium endométrial et l'embryon est fondamental, mais il reste encore à identifier les signaux prédominants de ce dialogue et à définir les caractéristiques de l'endomètre réceptif, c'est-à-dire de mieux définir ce concept de "fenêtre implantatoire".

Les signaux embryonnaires comme l'hCG, le TGFβ1, l'IGF1 et l'IGF2 stimulent la production endométriale de LIF en culture. Par ailleurs, l'hCG et le TGFβ1 inhibent la production endométriale d'IL6. Ainsi, ces données suggèrent qu'un signal du blastocyste tel que la production d'hCG jouerait un rôle actif dans l'implantation et dans la tolérance maternelle.

## ■ RÉFÉRENCES

1. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359 (6390): 76-9.
2. Stewart CL. Leukaemia inhibitory factor and the regulation of pre implantation development of the mammalian embryo. *Mol Reprod Dev* 1994; 39(2): 233-8.
3. Simon C, Mercader A, Gimeno MJ, Pellicer A. The interleukin-1 system and human implantation. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37(1): 64-72.
4. Perrier d'Hauterive S, Charlet-Renard C, Berndt S, Dubois M, Munaut C, Noël A, Goffin F, Hazout A, Foidart JM, Geenen V. Involvement of blastocyst-derived human chorionic gonadotrophin (hCG) in the control of leukaemia inhibitory factor (LIF) and interleukin 6 (IL6) secretion by human endometrial epithelium *in vitro*. Submitted.