



L'essentiel de l'information
scientifique et médicale

www.jle.com

Le sommaire de ce numéro

<http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/medecine/mtm/sommaire.md?type=text.html>

volume 9
numéro 6
mois nov-déc. 2007

mt
médecine thérapeutique

Numéro coordonné par
Didier Dewailly
et Samir Hamamah

ACTUALITÉS
Jean-Pierre Dadoine, Jacques Hansoune

REVUE

Anomalies chromosomiques de l'ovocyte humain : formation, étiologie et détection
Frank Pellstorfer, Samir Hamamah

L'ovocyte et l'embryon, de la morphologie aux gènes
Samir Hamamah, Delphine Haouzi, Stephan Gouso, Frank Pellstorfer, Tal Anahary, John De Vos, Hervé Dechaud

Y-a-t-il un marqueur décisif de l'implantation embryonnaire ?
La place du couple HCG-LH/hCGR à l'interface materno-fœtale
Sophie Perrier d'Hauterive, Marie Isaacopulos, Jean-Michel Foidart, Vincent Geenen

Les limites actuelles des techniques d'assistance médicale à la procréation intraconjugale en biologie
Brigitte Leroy-Martin

Les limites des techniques d'assistance médicale à la procréation pour le clinicien
Catherine Lefebvre

Le don d'ovocytes : état des lieux
Sophie Colteu-Jonard

Pourquoi tant de frilosité dans la mise en place de l'accueil d'embryons en France ?
Christine Waltemer, Karima Bettahar-Labuglo, Isabelle Galland, Alexandre Fernandez

Les limites de la génétique : quelle place pour le diagnostic prénatal ?
Samir Hamamah, Tal Anahary, Frank Pellstorfer, Vanessa Loup, Lionel Rayfman, Hervé Dechaud, Bernard Hezon

ANALYSE D'OUVRAGE

www.jle.com
John Libbey EUROTEXT
ISSN 1774-6405 - Prix du numéro : 44 €

Montrouge, le 06/02/2008

S. Perrier d'Hauterive

Vous trouverez ci-après le tiré à part de votre article en format électronique (pdf) :

Y a-t-il un marqueur décisif de l'implantation embryonnaire ?

paru dans

Médecine de la Reproduction, 2007, Volume 9, Numéro 6

John Libbey Eurotext

Ce tiré à part numérique vous est délivré pour votre propre usage et ne peut être transmis à des tiers qu'à des fins de recherches personnelles ou scientifiques. En aucun cas, il ne doit faire l'objet d'une distribution ou d'une utilisation promotionnelle, commerciale ou publicitaire.

Tous droits de reproduction, d'adaptation, de traduction et de diffusion réservés pour tous pays.

© John Libbey Eurotext, 2007

Y a-t-il un marqueur décisif de l'implantation embryonnaire ?

La place du couple hCG-LH/hCGR à l'interface materno-fœtale

Is there a decisive marker of embryo implantation?

The place of the hCG-LH/hCGR couple at the materno-fetal interface

Sophie Perrier d'Hauterive^{1,2}

Marie Tsampalas²

Jean-Michel Foidart³

Vincent Geenen⁴

¹ Université de Liège, Département de Gynécologie-Obstétrique, Centre de procréation médicalement assistée de Liège – CHR de la Citadelle, boulevard du 12^e de Ligne 1, 4000 Liège, Belgique

² Université de Liège, Centre d'Immunologie, Institut de Pathologie CHU B23, 4000 Liège-Sart Tilman, Belgique <sperrier@skynet.be>

³ Université de Liège, Département de Gynécologie-Obstétrique, CHR de la Citadelle, boulevard du 12^e de Ligne, 4000 Liège, Belgique

⁴ Directeur de recherches au Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) de Belgique. Université de Liège, Centre d'Immunologie, Institut de Pathologie CHU B23, 4000 Liège-Sart Tilman, Belgique

Résumé. L'implantation de l'embryon dans l'endomètre maternel est un phénomène unique, associant un paradoxe immunologique (tolérance d'une allogreffe) et biologique (adhésion de deux épithéliums). La réussite du processus dynamique de l'implantation engage deux acteurs principaux : l'endomètre et l'embryon, tous deux dialoguant sur le mode juxtacrine/paracrine à l'interface materno-fœtale. Bien que les stéroïdes sexuels soient les acteurs de première ligne, une série de cytokines et de facteurs paracrines sont les médiateurs privilégiés du dialogue à l'interface materno-fœtale. L'endomètre est l'un des rares tissus dans lequel l'embryon ne peut pas s'implanter, excepté au cours d'une période limitée (*fenêtre implantaire*), requise pour l'établissement du dialogue, notamment *via* le signal le plus spécifique de l'embryon : l'hormone chorionique gonadotrope (hCG). L'absence de contrôle de l'implantation reste un obstacle majeur au succès de la grossesse en procréation médicalement assistée. Lever une partie du voile qui persiste sur la cascade complexe des événements établis au moment de l'implantation et sur le rôle primordial de chacun des protagonistes (endomètre et embryon), c'est l'objectif que s'est fixé la recherche actuelle. L'étude de l'endomètre et de la réceptivité utérine peut ouvrir de nouvelles perspectives diagnostiques et thérapeutiques, tout comme la meilleure connaissance de l'embryon et de sa physiologie mais surtout du dialogue materno-fœtal. Pour comprendre ce processus complexe qu'est l'implantation, de nouvelles techniques sont maintenant à la disposition des chercheurs. Les défis de la recherche du futur seront d'élucider le tableau complet des différents facteurs qui influencent l'implantation et d'identifier des marqueurs fiables d'implantation pathologique ou déficiente. La mise en évidence de tels biomarqueurs révolutionnerait la pratique clinique dans le domaine de l'infertilité mais aussi dans le cadre de pathologies de l'implantation.

Mots clés : implantation, réceptivité utérine, hCG

Abstract. Implantation of the embryo into the maternal endometrium represents a unique biological process, combining an immunological (tolerance of an allograft) and biological (adhesion of two epithelium) paradox. The success of the dynamic process of implantation requires two important actors : endometrium and blastocyst, the endometrium and the embryo, both dialoguing on the juxtacrine/paracrine mode with the maternal-fetal interface. Though sexual steroids control the process, a *cascade* of growth factors or cytokines are the private paracrine mediators of the dialogue at the maternal-embryonic interface. The endometrium is one of the rare tissues in which the embryo cannot implant, except during one limited period (implantation window), required for the establishment of the dialogue, in particular *via* the most specific signal of the embryo : the chorionic hormone gonadotrope (hCG). The absence of control of the implantation remains a major hurdle with the success of the pregnancy in assisted medical procreation. To raise part of the veil which persists on the complex cascade of the events established at the time of the implantation and on the central role of each protagonist (endometrium and embryo), it is the objective that set current research. The study of the endometrium and the uterine receptivity can open diagnostic and therapeutic new prospects, just like the best knowledge of the embryo and its physiology but especially of the maternal-fetal dialogue. To understand this complex process that is the implantation, new methods are now at the disposal of the researchers. The challenges of the research of the future will be to elucidate the complete table of the various factors which influence the implantation and to identify reliable markers of pathological or defective implantation. The description of such biomarkers would revolutionize the clinical practice in the field of infertility but also within the framework of pathologies of the implantation.

Key words : implantation, uterus receptivity, hCG

Tirés à part : S. Perrier d'Hauterive

Le succès de l'implantation embryonnaire est une étape cruciale de la reproduction, naturelle ou assistée. La manière dont le blastocyste s'appose, adhère à l'endomètre maternel tout en dialoguant avec lui et la façon dont le trophoblaste envahit, sans le détruire, le stroma endométrial tout en déjouant les mécanismes immunitaires maternels demeurent en 2008 les mystères de la reproduction humaine. La réussite du processus dynamique de l'implantation engage deux acteurs principaux : l'endomètre et l'embryon, tous deux dialoguant sur le mode juxtacrine/paracrine à l'interface materno-fœtale. La connaissance du versant embryonnaire a largement bénéficié de l'essor des techniques de fécondation *in vitro* (FIV) et de culture embryonnaire ; des critères morphologiques de sélection des embryons de plus en plus précis ont été progressivement établis. Du côté maternel, un endomètre réceptif est le prérequis inévitable, au travers d'une fenêtre d'implantation courte d'environ 4 jours (jours 20-24 du cycle menstruel) au cours de laquelle le dialogue materno-fœtal peut s'établir. Même si d'indéniables progrès ont été accomplis ces dernières années en procréation médicalement assistée (PMA), l'implantation n'en demeure pas moins une collaboration réussie (mais encore non élucidée sur le plan scientifique), finement régulée et étroitement coordonnée entre tissus maternels et embryonnaires, au carrefour entre l'endocrinologie et l'immunologie. L'absence de contrôle de l'implantation reste un obstacle majeur au succès de la grossesse. Un déficit d'implantation peut résulter d'une qualité ovocytaire ou embryonnaire médiocre, d'une mauvaise réceptivité endométriale, d'un dysfonctionnement hormonal, immunologique ou angiogénique.

Étape-clé du processus reproductif dans de nombreuses espèces, l'implantation implique un nombre important de mécanismes moléculaires qui ont évolué au cours du temps pour contrôler le processus [1]. Lever une partie du voile qui persiste sur la cascade complexe des événements établis au moment de l'implantation et sur le rôle primordial de chacun des protagonistes (endomètre et embryon), c'est l'objectif que s'est fixé la recherche actuelle. L'étude de l'endomètre et de la réceptivité utérine, mais surtout du dialogue entre eux, peut ouvrir de nouvelles perspectives diagnostiques et thérapeutiques, tout comme la meilleure connaissance de l'embryon et de sa physiologie. Sur 100 couples qui consultent en PMA, la fécondation pourra être obtenue pour 90 d'entre eux et 80 auront la chance d'avoir un transfert d'un ou plusieurs embryons. Cependant, seuls 20 à 25 pourront mener une grossesse jusqu'à son terme. Cette boîte noire qu'est l'implantation embryonnaire est le sujet d'investigation de nombreuses équipes de chercheurs dans le monde scientifique. Il est clair qu'à l'interface materno-fœtale coexistent de nombreux facteurs redondants et néanmoins complémentaires, accentuant la difficulté pour les chercheurs actuels de trouver les marqueurs spécifiques d'un endomètre réceptif

ou d'un embryon compétent. Pour comprendre ce processus complexe, de nouvelles techniques sont maintenant à la disposition des chercheurs et permettent d'investiguer soit le versant endométrial soit le versant embryonnaire et, plus encore, l'étroit dialogue qui s'établit entre ces deux protagonistes.

L'acteur embryonnaire

Pour pouvoir s'implanter dans l'endomètre maternel, l'embryon doit se développer de façon adéquate jusqu'au stade blastocyste. Cela implique un développement folliculaire adéquat, l'ovulation d'un ovocyte mature, la fécondation par un spermatozoïde de morphologie normale à l'ADN peu fragmenté et un développement embryonnaire précoce harmonieux [2]. La sélection des embryons à haut potentiel implantatoire est un défi important en PMA, à la fois pour augmenter les taux de grossesse, mais aussi pour éviter la cryopréservation massive d'embryons non viables. Bien que la meilleure méthode d'évaluation de la viabilité d'un embryon soit sa capacité à s'implanter, l'observation du développement de l'embryon *in vitro* a permis d'obtenir d'importantes informations à son sujet, tout en restant indépendant de l'influence non négligeable du milieu utérin. Ces dernières années, des critères morphologiques ont été développés et évalués pour identifier les embryons à haut potentiel implantatoire. En déterminant le score cumulé de l'embryon au jour 2 ou au jour 3 de culture, déterminé sur la base du nombre de blastomères et de leur taille, de la fragmentation et de la symétrie de l'embryon, le biologiste est en mesure de sélectionner les embryons les plus viables et les plus susceptibles de s'implanter. De manière générale, les embryons à 2 cellules en fin de jour 1, à 4-5 cellules au jour 2 et à minimum 7 cellules au jour 3, qui ne présentent pas plus de 20 % de fragmentation et qui n'ont aucun blastomère multinucléé sont considérés comme étant des embryons à haut potentiel implantatoire (*top quality embryo*) [3, 4]. Dans l'étude de Van Royen, ces embryons donnent lieu à une grossesse évolutive dans 49 % des cas. Des études plus récentes visent à étudier d'autres critères morphologiques attestant de la qualité embryonnaire comme la distribution des fragments dans le volume embryonnaire, la morphologie du premier globule polaire, l'orientation et la morphologie des pronuclei, le clivage précoce, et l'identification des blastomères multinucléés. Chacune de ces caractéristiques indépendamment utilisées pour le choix de l'embryon à transférer a permis l'augmentation des taux d'implantation. Ainsi, un système de gradation embryonnaire incluant les caractéristiques du stade « pronucleus » au stade blastocyste pourrait à terme permettre le choix des embryons supérieurs à transférer et maintenir des taux de grossesse acceptables tout en réduisant le nombre d'embryons replacés en PMA [5, 6]. Le transfert de blastocystes

offre une alternative pour augmenter la sélection embryonnaire sur la base de son potentiel de développement après l'activation du génome embryonnaire tout en améliorant la synchronisation avec l'endomètre [7, 8]. L'ensemble de ces critères donne une information morphologique mais non fonctionnelle des embryons ; ils ne nous permettent pas de déterminer leur potentiel de développement ultérieur. En effet, Guerif *et al.* ont récemment remarqué que l'observation des embryons sur base de leur développement précoce (morphologie des pronuclei, clivage précoce, nombre cellulaire et fragmentation au jour 2) avait une valeur prédictive faible de leur potentiel de développement [9]. Des critères additionnels ou nouveaux sont donc nécessaires. L'élaboration de méthodes de détermination de la compétence embryonnaire, par des techniques non invasives, constitue une aire de recherche très active. Ces méthodes portent principalement sur l'analyse des milieux de culture des embryons ou des fluides folliculaires avec dosage de molécules issues du métabolisme folliculaire ou embryonnaire et produites précocement par lui (IL-1, IL-10, sHLA-G). Sur le plan de la recherche fondamentale, les nouvelles techniques de génomique et de protéomique s'attellent à caractériser l'ovocyte, le follicule et l'embryon humain, dans le but de dépister de nouveaux marqueurs plus précoces, plus spécifiques, utilisables en clinique [10-13].

L'acteur endométrial

La préparation adéquate de l'endomètre par les œstrogènes en phase proliférative, puis par la sécrétion œstroprogestative du corps jaune induit les modifications endométriales structurales et moléculaires permettant à un embryon compétent de s'implanter au cours de la mi-phase sécrétoire. L'implantation embryonnaire est cependant un phénomène restreint, seulement observable au cours d'une période extrêmement limitée - la fenêtre implantatoire - [14] au cours de laquelle l'endomètre offre une réceptivité maximale à l'embryon. La durée de la fenêtre implantatoire est particulière à l'espèce. Chez la femme, cette fenêtre s'étend du J20 au J24 d'un cycle menstruel normal, soit de LH+7 à LH+11 [15]. En dehors de cette fenêtre, l'endomètre n'est pas réceptif, voire même réfractaire à l'implantation, contrairement à tout autre tissu du corps humain. Bien que l'implantation soit un processus dynamique entre blastocyste et tissu maternel, la préparation de l'endomètre au cours de la fenêtre implantatoire est purement d'origine maternelle.

En termes moléculaires, la réceptivité de l'endomètre résulte à la fois de l'acquisition de ligands ou de récepteurs facilitant l'apposition, l'adhésion, puis l'invasion trophoblastique, et de la perte de composants faisant barrière à l'embryon en voie d'apposition [16]. L'étude histologique et fonctionnelle de l'endomètre en fenêtre implantatoire

est limitée par d'importants inconvénients méthodologiques, mais aussi éthiques, raisons pour lesquelles les mécanismes moléculaires induisant la réceptivité utérine ne sont pas encore tous élucidés. Jusqu'à présent, il n'existe aucune définition moléculaire claire de la fenêtre implantatoire et aucun modèle humain *in vitro* ne peut donner une idée satisfaisante de la cascade exacte d'événements, sur le rôle des nombreux et redondants facteurs moléculaires présents à l'interface materno-fœtale, ni même sur les mécanismes régissant la tolérance maternelle à l'allogreffe fœtale. De nombreuses études ont identifié une série de biomarqueurs sous contrôle des œstrogènes et de la progestérone, participant au processus implantatoire de façon permissive ou inhibitrice. On retrouve parmi ces facteurs des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance, des métalloprotéases matricielles (MMP), des molécules d'adhésion, des cellules immunitaires, des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, etc. [17].

En tant que premier point de contact entre embryon et endomètre, l'épithélium endométrial luminal est non réceptif au cours des phases prolifératives et sécrétoires précoces. Sa transformation en un endomètre réceptif au cours de la mi-phase sécrétoire implique d'importantes modifications d'expression, d'organisation ou d'activation de systèmes d'adhésion. L'endomètre et la decidua sont infiltrés par une série de cellules immunitaires, les prédominantes étant de larges lymphocytes appelés cellules *natural killer* utérines (uNK), des cellules T et des macrophages [18]. C'est au niveau de la microscopie électronique que des paramètres moléculaires de cet épithélium que la recherche s'oriente pour obtenir des informations sur la réceptivité endométriale et l'implantation embryonnaire. Certaines modifications ultrastructurales ou biochimiques ont ainsi pu être observées au moment de la fenêtre implantatoire, représentant autant de marqueurs potentiels de la réceptivité endométriale. De nouveaux outils nous permettent de rechercher ces facteurs : microdamiers, luminex, microdissection laser, liquide de lavages utérins, spectrométrie de masse. Outre les informations sur des marqueurs endométriaux déjà évalués, ces nouvelles technologies ont également permis de mettre en évidence de nouveaux gènes non connus antérieurement pour jouer un rôle dans l'implantation [19]. Une analyse plus poussée de leur régulation hormonale, de même que de la localisation spatio-temporelle et de la fonction du produit de ces gènes est cependant indispensable pour décrypter la cascade de régulation de la réceptivité utérine [20-22]. Simultanément à l'augmentation de nos connaissances moléculaires de l'endomètre, le transfert de cette recherche fondamentale à la pratique clinique (recherche « translationnelle ») reste assez pauvre et à l'heure actuelle, il n'existe malheureusement aucun marqueur de réceptivité utilisable de façon sûre, spécifique et reproductible en clinique. Plusieurs candi-

datés ont pourtant été proposés sans qu'aucun ne soit à lui seul spécifique. Nous n'en ferons qu'une description résumée.

Les pinopodes

Protrusions apicales des cellules épithéliales de l'endomètre, ils apparaissent entre les jours 19 et 21 d'un cycle normal. Ouvrant la fenêtre implantatoire, ils ne seraient pas présents pendant toute sa durée [14], bien que cela soit actuellement controversé [23]. Leur présence est strictement contrôlée par la progestérone. L'adhérence du trophoblaste à la membrane des pinopodes se fait probablement *via* des molécules d'adhésion comme les E-cadhérines, présentes sur la surface cellulaire des pinopodes épithéliaux [24]. Il existe également une corrélation entre le nombre de pinopodes et le taux d'implantation après transfert d'embryons [25]. Leur présence coexiste avec la fenêtre d'expression endométriale d'autres marqueurs présumés de la fenêtre implantatoire comme les intégrines $\alpha\beta3$ [26], l'*heparin-binding epidermal growth factor* (HB-EGF) [27] et le *leukemia inhibitory factor* [28]. La corrélation entre le moment d'apparition des pinopodes dans le cycle et la fenêtre implantatoire, leur localisation spatiale à la surface luminale de l'endomètre, et les études *in vitro* ayant révélé leurs interactions avec l'embryon, sont autant d'arguments en faveur d'un rôle de ces structures dans la réceptivité endométriale. Cependant, la variabilité d'apparition de ceux-ci d'un cycle à l'autre et la nécessité de réaliser des biopsies dans la fenêtre implantatoire pour recourir à la microscopie électronique limitent la possibilité de leur exploration en clinique courante.

Les molécules d'adhésion

Les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire jouent un rôle primordial dans la cascade d'événements conduisant à l'implantation et au développement normal de l'embryon puis du fœtus au cours de la grossesse. L'implantation requiert l'établissement de contacts étroits entre les deux pôles apicaux des cellules épithéliales trophoblastiques et endométriales, ce qui représente un véritable paradoxe biologique. Les molécules d'adhésion, les molécules de la matrice extracellulaire (MEC) et leurs enzymes protéolytiques (MMP, TIMP) sont largement étudiées dans le but de reconstituer le puzzle de l'adhésion, de l'invasion et de la différenciation trophoblastiques, étapes primordiales de l'implantation [29]. Les molécules d'adhésion sont exprimées avec une variation spatio-temporelle sur l'épithélium et le stroma endométriaux, sur l'embryon et le trophoblaste. En tant que médiateurs de l'attachement cellulaire et de la transduction, leur expression variable au cours du temps est peut-être une clé pour la compréhension de la réceptivité utérine [30].

Parmi les molécules d'adhésion, on retrouve les intégrines qui constituent une famille de récepteurs transmembranaires composés de 2 sous-unités : α et β . Outre

les intégrines constitutives, l'endomètre exprime également des intégrines sous contrôle hormonal : $\alpha1\beta1$ et $\alpha4\beta4$ apparaissent de manière concomitante à l'apparition de la progestérone et lorsque les récepteurs de la progestérone (PR) sont à leur expression maximale ; l' $\alpha\beta3$ apparaît quand la sécrétion de progestérone est maximale mais aussi quand l'expression des PR est minimale [31]. Ces trois intégrines ne sont présentes conjointement que lors de la fenêtre implantatoire. Une modification de ce profil d'expression des intégrines endométriales est associée à une réduction de réceptivité de l'endomètre, et a été observée dans des endomètres de patientes présentant des échecs d'implantation [32], mais non chez les patientes présentant des fausses couches à répétition [33]. Les intégrines et surtout l' $\alpha\beta3$ interviendraient dans les interactions entre blastocyste et épithélium au moment de l'implantation ; l'expression de ces intégrines paraît importante pour l'adhésion et l'invasion trophoblastiques et pour toute la signalisation qui en découle.

La place exacte des deux marqueurs de surface décrits ci-dessus dans la définition de la fenêtre implantatoire, et plus particulièrement de la réceptivité utérine, est encore imprécise. La comparaison de l'expression conjointe des pinopodes et de l' $\alpha\beta3$ entre femmes fertiles et infertiles n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les deux groupes [34].

La L-sélectine est un autre membre de la famille des molécules d'adhésion. Elle est exprimée au niveau de la paroi vasculaire où elle fixe les leucocytes et les concentre dans le site où ils sont requis après activation des intégrines. Un processus similaire est proposé au moment de l'implantation. L'embryon exprime la L-sélectine après l'éclosion de la zone pellucide et des protéines glycosylées, ligands de la sélectine, sont exprimées en début de fenêtre implantatoire permettant à l'embryon d'être capté au niveau de l'épithélium et d'interagir avec les intégrines [35].

Les mucines

Glycoprotéines de haut poids moléculaire, elles interviennent dans la constitution du glycocalyx à la surface des cellules épithéliales de l'endomètre. MUC-1 est plus particulièrement étudiée. La présence d'un embryon pré-appositionnel stimule à la surface de l'épithélium l'expression de MUC-1, qui est secondairement clivée par l'embryon pour permettre son adhésion à l'endomètre au site le plus approprié [36].

Les cytokines

Plusieurs cytokines et leurs récepteurs ont une expression dans l'endomètre qui varie au cours du cycle menstruel avec un maximum au cours de la fenêtre implantatoire. Ces nombreuses et redondantes molécules représentent, par leur présence ou leur absence au mo-

ment de ladite fenêtre, de potentiels marqueurs de réceptivité utérine : le système LIF, le système interleukine (IL)-1, l'IL-11, l'IL-12, l'IL-15, l'IL-18, le CSF [37]. Des profils pathologiques d'expression du tripode IL-18, IL-12 et IL-15 sont retrouvés chez des patientes présentant des échecs répétés d'implantation [38].

Une série d'autres molécules voient également leur expression se modifier spécifiquement au cours de la fenêtre implantatoire, représentant autant de marqueurs potentiels : l'HB-EGF, le gène homéotique *HOXA10*, la galectine, etc.

Le dialogue à l'interface materno-fœtale

Des avancées considérables ont été faites dans la compréhension, en tant qu'entités séparées, de la biologie cellulaire de l'embryon humain (grâce au progrès de la PMA) et de la physiologie de l'endomètre (grâce aux progrès de la biologie moléculaire). Cependant, la communication entre ces deux protagonistes et leurs influences réciproques constituent encore un problème non résolu de la médecine de reproduction. Ce dialogue s'établit par l'intermédiaire de cytokines, de chimiokines, de facteurs de croissance ou de molécules d'adhésion ; autant de facteurs redondants et complémentaires produits et sécrétés à l'interface materno-fœtale.

Les prérequis d'une implantation réussie sont l'enfouissement du conceptus dans la paroi utérine, l'élaboration d'un réseau vasculaire permettant le développement optimal de l'embryon puis du fœtus, et la protection de l'allogreffe fœtale d'un rejet par le système immunitaire maternel compétent. Pour atteindre ces objectifs, d'étroits dialogues s'établissent entre la decidua, l'embryon et le placenta [39]. L'étude des étapes successives de l'implantation chez les mammifères, y compris l'espèce humaine, a montré combien les interactions endocriniennes, immunologiques et physiologiques doivent être étroitement coordonnées durant les premières phases de l'implantation. L'importance relative de chacun de ces facteurs au succès de l'implantation est difficilement estimable. De petites erreurs de sécrétion ou d'action de certaines molécules peuvent sérieusement mettre en péril l'ensemble du processus implantatoire bien que des mécanismes de compensation puissent prévenir l'échec [40]. Le rendement de l'implantation embryonnaire humaine reste remarquablement faible, puisqu'on estime que l'implantation ne s'établit avec succès que dans environ 30 % des cas. On estime que les troubles de l'implantation sont en cause dans 25 % des fausses couches, surtout précoces [41].

Pour des raisons évidentes, il existe peu d'observations documentant les premières semaines du développement embryonnaire chez la femme. L'étape pourtant cruciale

de l'implantation humaine n'est donc pas directement à la portée des chercheurs et des cliniciens dans l'espèce humaine. Elle est par contre approchée par divers modèles animaux. Etant donné que les interactions cellulaires qui se produisent lors de l'implantation et la placentation varient fortement d'une espèce à l'autre – et même au sein d'une même espèce – ces informations ne peuvent être transposées qu'avec prudence à l'espèce humaine.

Certaines grandes étapes ont cependant été identifiées dans l'implantation embryonnaire et la formation du placenta chez l'animal ; elles pourraient très vraisemblablement être transposées à l'implantation humaine (figure 1).

L'apposition

Cette phase initiale est instable, résultant de l'interrelation entre le trophoblaste et l'épithélium endométrial. A ce stade, le blastocyste entre dans la proximité directe de l'endomètre, permettant aux médiateurs solubles comme l'hCG, les cytokines et les facteurs de croissance d'établir un dialogue à l'interface materno-fœtale. Il se produit également à ce moment la présentation d'un répertoire unique de molécules d'adhésion à la surface à la fois des cellules maternelles et fœtales, étape indispensable à la phase d'adhésion du trophoctoderme à l'épithélium endométrial.

L'adhésion

Cette phase implique des connexions physiques entre le trophoblaste et l'endomètre, par l'intermédiaire de molécules d'adhésion comme les sélectines, les intégrines et les trophinines, exprimées à la fois par les cellules trophoblastiques et l'épithélium endométrial [42]. A ce stade, il n'est plus possible de déplacer l'embryon sans dommage pour les tissus.

Des interactions précoces entre le trophoblaste et l'épithélium utérin s'établissent, la densité des desmosomes situés sur les parois latérales des cellules épithéliales de l'endomètre se réduit et la membrane basale est digérée, contribuant au détachement des cellules entre elles. L'embryon induit lui-même l'expression de récepteurs épithéliaux favorables à son implantation, renforçant le concept de dialogue entre embryon et endomètre [30]. Il joue même une part importante dans le contrôle de l'expression génétique de l'endomètre [43]. Par ailleurs, lorsque le blastocyste adhère à l'épithélium, il induit une réaction de mort cellulaire endométriale massive en périphérie du site d'implantation permettant au blastocyste de passer la barrière épithéliale, étape indispensable à l'invasion de l'endomètre. L'adhésion de l'embryon induit également des modifications de la couche cellulaire sous-jacente (le stroma), initiant ainsi leur développement en tant que versant maternel du placenta : œdème, modifications locales de la matrice conjonctive et de la morphologie des cellules stromales, multiplication des vaisseaux capillaires, modification de la population de cellules im-

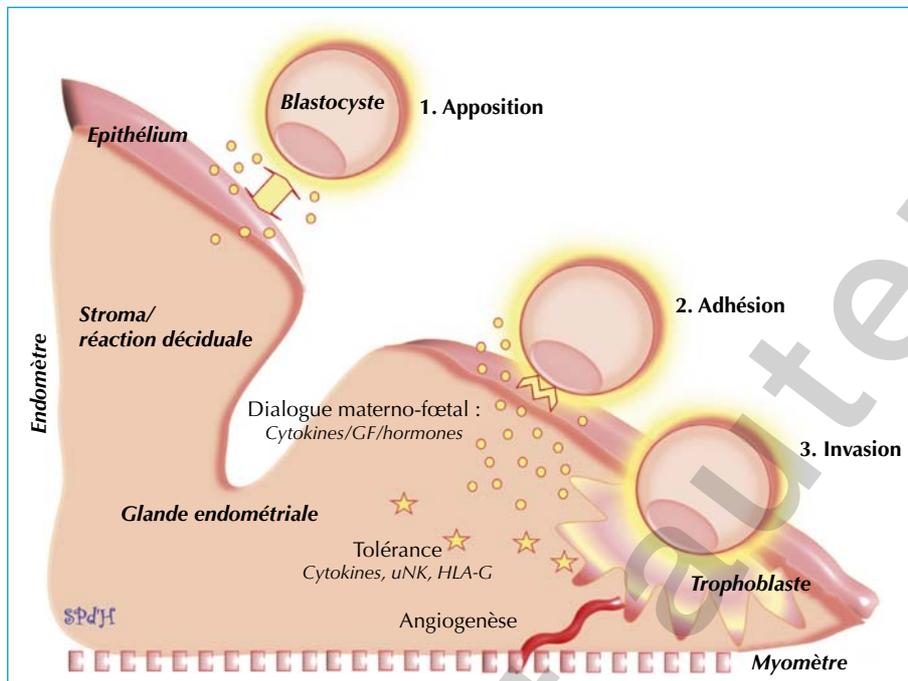


Figure 1. Les grandes étapes de l'implantation embryonnaire chez la femme (S. Perrier d'Hauterive).

munitaires utérines. On parle ainsi de la réaction déciduale. La décidualisation se poursuit au cours de la grossesse, contrôlant probablement l'invasion trophoblastique et la formation du placenta, *via* l'altération de l'expression des métalloprotéinases, des cytokines, des intégrines de surface et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. Le trophoblaste en retour libère des signaux qui modulent le profil d'expression génique des cellules stromales de l'endomètre [39]. L'invasivité du conceptus dépend de l'efficacité de cette réaction déciduale : si elle est pathologique ou inefficace, l'invasion trophoblastique peut être beaucoup trop agressive et plus pénétrante (exemple du placenta accreta). L'invasion trophoblastique peut également être insuffisante avec des conséquences non négligeables plus tardivement dans la grossesse (RCIU, prééclampsie).

L'invasion et le développement trophoblastiques

Au cours de cette étape, le syncytiotrophoblaste se forme et va envahir le tissu maternel. Le fœtus et la mère contribuent à l'organisation structurelle du placenta, un organe nouvellement formé qui joue un rôle clé dans la progression régulière de la grossesse jusqu'à terme. Les cellules trophoblastiques qui constituent le placenta prolifèrent, migrent et envahissent l'utérus et sa vascularisation afin de subvenir aux besoins de l'embryon puis du fœtus, d'une manière imitée par les tumeurs malignes. Contrairement à ces tumeurs, l'invasion de l'endomètre par le trophoblaste est strictement contrôlée et limitée au

site d'implantation. Le trophoblaste, transplanté dans d'autres organes ou s'implantant sur une cicatrice utérine se montre toujours plus invasif. L'invasion du trophoblaste dans la decidua est primordiale pour l'établissement d'une grossesse normale. Au cours de ce processus, les cellules trophoblastiques vont subir une remarquable différenciation leur permettant de participer à différentes fonctions distinctes du placenta. La clé d'une placentation réussie est l'orchestration fine et contrôlée de la vasculogenèse, de l'angiogenèse, de la tolérance immunitaire et des fonctions trophoblastiques, par un large nombre de facteurs hétérogènes (cytokines, chimiokines, cellules uNK, facteurs de croissance) agissant sur le mode autocrine et paracrine [44, 45].

Marqueurs : d'autres pistes

L'hCG trophoblastique et son récepteur endométrial LH/hCGR

L'hCG est l'une des molécules les plus précocement produites par l'embryon et la plus spécifique de sa présence. Au stade blastocyste, les transcrits de l'*HCG* sont détectés dans le trophoblaste et la production d'hCG par le blastocyste débute avant même son implantation. Des taux significatifs d'hCG peuvent être mesurés dans le sang maternel 10 jours après l'ovulation.

A la lumière d'études récentes, il est de plus en plus évident que l'hCG intervient dans la régulation de la différenciation endométriale et dans le processus implan-

tatoire au sens large avec un impact aux différentes phases de l'implantation [46]. Ces effets paracrines ou juxtacrines de l'hCG précéderaient le rôle endocrine classique de l'hormone. Une action locale de l'hCG à l'interface materno-fœtale implique la présence de son récepteur, le LH/hCGR, dans l'endomètre. L'expression du LH/hCGR a été initialement décrite dans les tissus gonadiques : ovaire et testicule. Malgré de nombreuses études démontrant l'existence du LH/hCGR au niveau extra-gonadique, et endométrial plus particulièrement [47-48], il a longtemps existé un débat quant à la présence d'une forme complète et fonctionnelle du récepteur ou plutôt d'isoformes tronquées sans activité physiologique, voire même d'un variant encore inconnu du récepteur. La publication de Licht *et al.* et nos propres travaux pourraient avoir mis fin à la controverse [49].

A l'université de Liège, nous avons également étudié l'expression de LH/hCGR dans l'endomètre humain. Tout d'abord, au niveau de l'ARNm, la RT-PCR a permis de mettre en évidence les transcrits du récepteur dans le tissu endométrial entier, dans les cellules stromales et dans les cellules épithéliales isolées à partir de biopsies d'endomètres réalisées chez des patientes fertiles [50]. Nous avons observé que l'expression de LH/hCGR est accrue au cours de la mi-phase sécrétoire et donc au moment de la fenêtre implantatoire (soumis). La cinétique d'expression du LH/hCGR que nous avons observée suggère que ce récepteur pourrait constituer un marqueur de la réceptivité endométriale et de la fenêtre implantatoire. La relation

entre le niveau d'expression du récepteur et la réceptivité utérine doit encore être élucidée par d'autres expériences.

Nous avons observé qu'en interagissant avec son récepteur présent au niveau des cellules épithéliales endométriales, l'hCG induit une augmentation importante de leur production de LIF, une cytokine indispensable au succès de l'implantation chez la souris. L'hCG induit également la réduction de la production d'IL-6 pro-inflammatoire par les cellules épithéliales utérines *in vitro* [50], favorisant la tolérance maternelle de l'allogreffe fœtale. Enfin, nous avons étudié l'impact de l'hCG sur la production de VEGF par des cellules épithéliales d'endomètre *in vitro*. Nos résultats suggèrent que l'épithélium endométrial est capable de répondre au signal spécifiquement envoyé par un embryon en voie d'apposition par la production de VEGF et de stimuler ainsi l'angiogenèse au niveau des vaisseaux sous-jacents (*figure 2*). Par ailleurs, une fois les premières phases d'apposition et d'adhésion accomplies, l'embryon en phase d'invasion continue à produire de l'hCG qui est lui aussi capable de stimuler directement l'angiogenèse [51]. Ainsi, l'hCG est le signal embryonnaire spécifique le plus précocement exprimé à l'interface materno-fœtale. De plus, l'endomètre est apte à répondre à ce signal embryonnaire puisqu'il en exprime le récepteur spécifique au moment de l'implantation. Nos résultats corroborent les résultats observés dans la littérature sur les effets paracrines de l'hCG en tant que molécule multipotente, favorisant l'implantation [52-53], l'angiogenèse [54], et la tolérance du système immunitaire maternel [55].

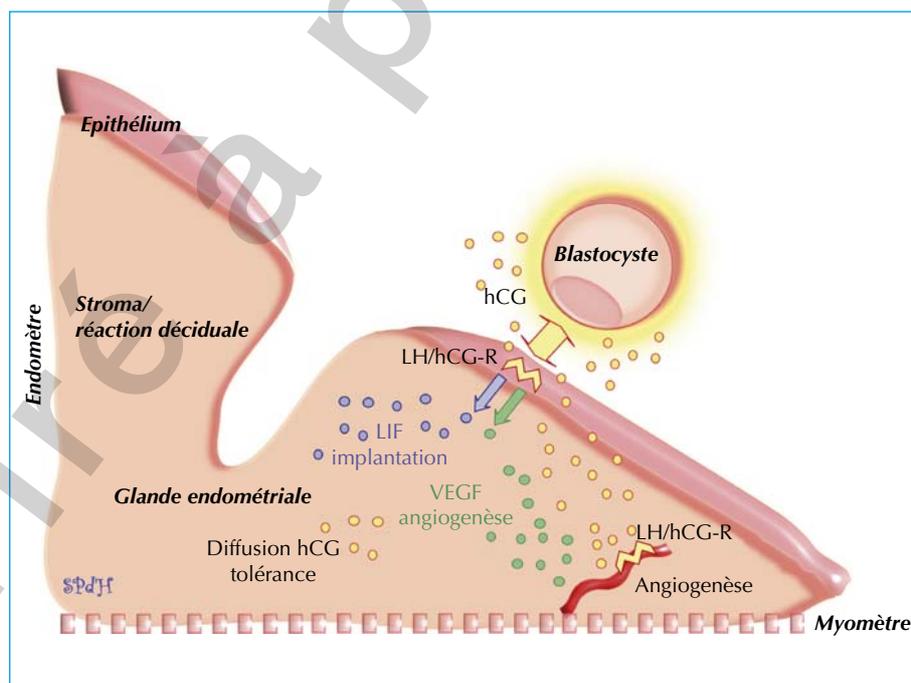


Figure 2. Effets paracrines de l'hCG sur l'épithélium endométrial (S. Perrier d'Hauterive).

Un marqueur embryonnaire : la protéine HLA-G soluble

HLA-G est une molécule HLA de classe Ib non classique aux propriétés immunorégulatrices multiples. Sa fonction principale, dans des conditions physiologiques, est d'établir la tolérance maternelle à l'interface materno-fœtale et ce, de différentes manières : *via* une fonction immunosuppressive vis-à-vis des cellules T CD8+ et CD4+, *via* la modulation de l'immunité innée par l'interaction avec les récepteurs KIR des cellules uNK, ce qui modifie la sécrétion cytokinique de celles-ci et, enfin, *via* le contrôle de l'angiogénèse lors de la placentation. Il existe plusieurs isoformes de HLA-G : 4 formes liées à la membrane cellulaire (HLA-G1, -G2, -G3, -G4) et 3 formes solubles (HLA-G5 ou sHLA-G1, -G6 ou sHLA-G2, et -G7 peu décrit). Il existe encore une autre forme soluble, issue du clivage protéique de HLA-G1 de la surface cellulaire [56]. Un certain nombre de publications ont, ces dernières années, démontré que sHLA-G pouvait être détecté dans le milieu de culture des embryons issus de FIV et que le niveau d'expression pouvait être corrélé au potentiel implantatoire de l'embryon [57-60]. Ces résultats ont évidemment suscité un vif intérêt pour la PMA. Cependant, il existe une controverse portant sur certains aspects de ces études, notamment la sensibilité des dosages utilisés, les conditions de culture embryonnaire, les taux de sHLA-G mesurés, et l'origine (ovocytaire ou embryonnaire) du sHLA-G. De plus, d'autres équipes n'ont pas retrouvé ces effets prédictifs de sHLA-G ou n'ont pas mis en évidence de sHLA-G dans les surnageants embryonnaires [61-63]. Il reste du travail avant de pouvoir mesurer en routine clinique le sHLA-G : tout d'abord comprendre pourquoi certains laboratoires ne trouvent pas de corrélation entre la sécrétion de sHLA-G par les embryons *in vitro* et la survenue de la grossesse ; ensuite, déterminer quelle(s) isoforme(s) de HLA-Gs est (sont) présente(s) dans les surnageants [64-65].

Conclusion

Les défis de la recherche du futur seront d'élucider le tableau complet des différents facteurs qui influencent les mécanismes de l'implantation et d'identifier des marqueurs fiables d'implantation pathologique ou déficiente. De façon générale, un biomarqueur doit être mesurable sur des échantillons rapidement accessibles et préférentiellement de façon non invasive. La spécificité et la sensibilité sont importantes mais aussi limitantes dans la sélection d'un marqueur, surtout dans le domaine de la PMA [66]. La mise en évidence de tels biomarqueurs révolutionnerait la pratique clinique dans le domaine de l'infertilité mais aussi dans le cadre de pathologies de l'implantation. Malgré les progrès indéniables de la PMA, l'absence de contrôle de l'implantation reste un obstacle

majeur au succès de la grossesse. Ces déficits d'implantation peuvent résulter d'une qualité ovocytaire ou embryonnaire médiocre, d'une mauvaise réceptivité endométriale, d'un dysfonctionnement hormonal, immunologique ou angiogénique. Les événements moléculaires intervenant dans l'apposition, l'adhésion puis l'invasion de l'embryon dans l'endomètre maternel sont les sujets d'investigation de nombreux chercheurs. Pour comprendre ce processus complexe, de nouvelles techniques sont maintenant à notre disposition comme le lavage de cavité utérine, les dosages luminex, la RT-PCR quantitative, la technique des microdamiers, et la protéomique. Des mécanismes très différents et souvent intriqués peuvent être à l'origine de l'échec d'implantation. Les avancées majeures réalisées grâce à la recherche fondamentale rendent chaque jour le processus plus complexe mais permettent d'entrouvrir les chemins diagnostiques et thérapeutiques du futur. A la lumière des connaissances actuelles, la question n'est donc pas : « Y a-t-il un marqueur de l'implantation embryonnaire ? », mais plutôt : « Peut-il y exister un marqueur de l'implantation embryonnaire ? ». Et si oui, ce marqueur serait-il folliculaire, ovocytaire, spermatique, embryonnaire ou endométrial ?

Remerciements

Ces recherches sont soutenues par le Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) de Belgique, la fondation Léon Fredericq et l'EMBIC (European Network of Excellence).

Références

1. Makrigiannakis A, Minas V. Mechanisms of implantation. *RBMOnline* 2007 ; 14 : 102-9.
2. Geary S, Moon Y. The human embryo in vitro. *J Reprod Med* 2006 ; 51 : 293-302.
3. Van Royen E, Mangelschot K, De Neubourg D, *et al.* Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999 ; 14 : 2345-9.
4. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, *et al.* Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development : a review. *Hum Reprod Update* 2003 ; 9 : 252-62.
5. Salumets A, Hyden-Granskog C. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod* 2003 ; 18 : 821-5.
6. Nagy Z, Dozortsev D, Diamond M, *et al.* Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. *Fertil Steril* 2003 ; 80 : 67-74.
7. Gardner D, Surrey E, Minjarez D, *et al.* Single blastocyst transfer : a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2004 ; 81 : 551-5.
8. Criniti A, Thyer A, Chow G, *et al.* Elective single blastocyst transfer reduces twin rates without compromising pregnancy rates. *Fertil Steril* 2005 ; 84 : 1613-9.
9. Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, *et al.* Limited value of morphological assessment at day 1 and 2 to predict blastocyst development potential : a prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod* 2007 ; 22 : 1973-81.

10. Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, *et al.* Gene expression in human cumulus cells : one approach to oocyte competence. *Hum Reprod* 2007 ; 22 : 3069-77.
11. Gasca S, Pellestor F, Assou S, *et al.* Identifying new human oocyte marker genes : a microarray approach. *Reprod Biomed Online* 2007 ; 14 : 175-83.
12. Katz-Jaffe M, Gardner D. Embryology in the era of proteomics. *Theriogenology* 2007 ; 68 : s125-s130.
13. Baumann C, Morris D, Sreenan J, Leese H. The quiet embryo hypothesis : molecular characteristics favoring viability. *Mol Reprod Develop* 2007 ; 74 : 1345-53.
14. Psychoyos A. Uterine receptivity for nidation. *Ann N Y Acad Sci* 1986 ; 476 : 36-42.
15. Navot D, Bergh P. Preparation of the human endometrium for implantation. *Ann N Y Acad Sci* 1991 ; 622 : 212-9.
16. Norwitz E, Schust D, Fisher S. Implantation and the survival of early pregnancy. *New Engl J Med* 2001 ; 345 : 1400-8.
17. Perrier d'Hauterive S, Charlet-Renard C, Goffin F, Foidart J-M, Geenen V. La fenêtre implantatoire. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2002 ; 31 : 440-55.
18. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, von Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update* 2006 ; 12 : 617-30.
19. Aghajanova L, Hamilton A, Giudice L. Uterine receptivity to human embryonic implantation : histology, biomarkers and transcriptomics. *Sem Cell Dev Biol* 2007 ; 22 ; in press.
20. Popovici R, Kao L, Giudice L. Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology* 2000 ; 141 : 3510-3.
21. Kao L, Tulac S, Lobo S, *et al.* Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002 ; 143 : 2119-38.
22. Riesewijk A, Martin J, van Os R, *et al.* Gene expression profiling of human endometrial receptivity on day LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003 ; 9 : 253-64.
23. Quinn M, Ryan E, Claessens A, *et al.* The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window. *Fertil Steril* 2007 ; 87 : 1015-21.
24. Staun-Ram E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol* 2005 ; 3 : 56-67.
25. Nikas G, Develioglu O, Toner J, Jones H. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod* 1999 ; 14 : 787-92.
26. Nikas G, Aghajanova L. Endometrial pinopodes : some more understanding on human implantation? *Reprod Biomed Online* 2002 ; 4 : 18-23.
27. Stavreus-Evers A, Aghajanova L, Brismar H, Eriksson H, Landgren B, Hovatta O. Co-existence of heparin-binding epidermal growth factor and pinopodes in human endometrium at the time of implantation. *Mol Hum Reprod* 2002 ; 8 : 765-9.
28. Aghajanova A, Stavreus-Evers Y, Nikas O, *et al.* Coexpression of pinopodes and LIF, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertil Steril* 2003 ; 79 : 808-14.
29. Pafilis J, Batistatou A, Iliopoulou E, *et al.* Expression of adhesion molecules during normal pregnancy. *Cell Tissue Res* 2007 ; 329 : 1-11.
30. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 2006 ; 12 : 731-46.
31. Reddy K, Mangale S. Integrin receptors : the dynamic modulators of endometrial function. *Tissue Cell* 2003 ; 35 : 260-73.
32. Lessey B, Castelbaum A, Sawin S, Sun J. Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril* 1995 ; 63 : 535-42.
33. Tuckerman E, Laird S, Prakash A, Li T. Expression of integrins in the endometrium of women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2006 ; 83 : 755-7.
34. Creus M, Ordi J, Fabregues F, *et al.* Alpha3beta3 integrin expression and pinopod formation in normal and out-of-phase endometria of fertile and infertile women. *Hum Reprod* 2002 ; 17 : 2279-86.
35. Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, *et al.* Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 2003 ; 299 : 405-8.
36. Meseguer M, Aplin J, Caballero-Campo P. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod* 2001 ; 64 : 590-601.
37. Castro-Rendon W, Castro-Alvarez J, Guzman-Martinez C, Bueno-Sanchez J. Blastocyst-endometrium interaction : intertwining a cytokine network. *Braz J Med Biol Res* 2006 ; 39 : 1373-85.
38. Ledee-Bataille N, Bonnet-Chea K, Hosny G, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure. *Fertil Steril* 2005 ; 83 : 598.
39. Hess A, Hamilton A, Talbi S, *et al.* Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast : amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol of Reprod* 2007 ; 76 : 102-17.
40. Edwards R. Human implantation : the last barrier in assisted reproduction technologies? *Reprod Biomed Online* 2006 ; 13 : 887-904.
41. Laird S, Tuckerman E, Li T. Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online* 2006 ; 13 : 13-23.
42. Aplin J, Kimber S. Trophoblast-uterin interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol* 2004 ; 2 : 48-59.
43. Kashiwagi A, DiGirolamo C, Kanda Y, *et al.* The post-implantation embryo differentially regulates endometrial gene expression and decidualization. *Endocrinology* 2007 ; 148 : 4173-84.
44. Hannan N, Salamonsen L. Role of chemokines in the endometrium and in embryo implantation. *Curr Op Obstet Gynecol* 2007 ; 19 : 266-72.
45. Lunghi L, Ferreti M, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* 2007 ; 8 : 5-6.
46. Licht P, Fluhr H, Neuwinger J, Wallwiener D, Wildt L. Is chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *Mol Cell Endocrinol* 2007 ; 269 : 85-92.
47. Lin J, Lei Z, Lojun S, *et al.* Increased expression of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene in human endometrial carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 ; 79 : 1483-91.
48. Rao C, Lei Z. The past, the present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. *Mol Cell Endocrinol* 2007 ; 269 : 2-8.
49. Licht P, von Wolff M, Berkholz A, Wildt L. Evidence for cycle-dependent expression of full-length human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor mRNA in human endometrium and decidua. *Fertil Steril* 2003 ; 79(Suppl 1) : 718-23.
50. Perrier d'Hauterive S, Charlet-Renard C, Berndt S, *et al.* Human Chorionic Gonadotropin and Growth factors at the embryonic-endometrial interface control Leukemia inhibitory factor (LIF) and Interleukin 6 (IL-6) secretion by human endometrial epithelium. *Hum Reprod* 2004 ; 19 : 2633-43.

51. Berndt S, Perrier d'Hauterive S, Devy L, *et al.* Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium. *FASEB J* 2006 ; 20 : 2630-2.
52. Licht P, Russu V, Lehmeier S, Moll J, Siebzehnrübl E, Wildt L. Intrauterine microdialysis reveals cycle-dependent regulation of endometrial insulin-like growth factor binding protein-1 secretion by human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 2002 ; 78 : 252-8.
53. Fluhr H, Krenzer S, Deperschmidt M, Zwimer M, Wallwiener D, Licht P. Human chorionic gonadotropin inhibits IGF-BP1 and prolactin in decidualized human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2007 ; 86 : 236-8.
54. Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, *et al.* Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 ; 87 : 5290-6.
55. Ueno A, Cho S, Cheng L, *et al.* Transient upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by human chorionic gonadotropin downregulates autoimmune diabetes. *Diabetes* 2007 ; 56 : 1686-93.
56. Roussev R, Coulam C. HLA-G and its role in implantation. *J Assist Reprod Genet* 2007 ; 24 : 288-95.
57. Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, *et al.* HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol* 2002 ; 32 : 311-5.
58. Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, *et al.* Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 2004 ; 20 : 138-46.
59. Sher G, Keskinetepe L, Fish J, *et al.* Soluble HLA-G expression in phase 1 culture media at 46h after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer. *Fertil Steril* 2005 ; 83 : 1410-3.
60. Fish J, Keskinetepe L, Ginsburg M, Adamowicz A, Sher G. Graduated embryo score and soluble HLA-G expression improve assisted reproductive technology outcomes and suggest a basis for elective single-embryo transfer. *Fertil Steril* 2007 ; 87 : 757-63.
61. Van Lierop M, Wijnands F, Loke Y, *et al.* Detection of HLA-G by a specific sandwich ELISA using monoclonal antibodies G233 and 56B. *Mol Hum Reprod* 2002 ; 8 : 776-84.
62. Sageshima N, Shobu T, Awai K, *et al.* Soluble HLA-G is absent from human embryo culture : a reassessment of sHLA-G detection methods. *J Reprod Immunol* 2007 ; 75 : 11-22.
63. Menezo Y, Elder K, Viville S. Soluble HLA-G release by the human embryo : an interesting artefact? *Reprod Biomed Online* 2006 ; 13 : 763-4.
64. Le Bouteiller P, Tabiasco J, Parinaud J. Soluble HLA-G and implantation : frequently Asked questions. *Gynecol Obstet Invest* 2007 ; 64 : 134-7.
65. Sargent I, Swales A, Ledee N, Kozma N, Tabiasco J, Le Bouteiller P. sHLA-G production by human IVF embryos : can I be measured reliably? *J Reprod Immunol* 2007 ; 75 : 128-32.
66. Campbell K, Rocket J. Biomarkers of ovulation, endometrial receptivity, fertilisation, implantation and early pregnancy progression. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2006 ; 20 : 13-25.