



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



Dix-septièmes Journées nationales de la Fédération française d'étude de la reproduction
 (Paris, 19–21 septembre 2012)

Profil d'expression des cellules de la corona radiata chez les patientes présentant une réserve ovarienne diminuée

Molecular characterization of corona radiata cells from patients with diminished ovarian reserve

P. May-Panloup^{a,*,b}, V. Ferré-L'Hôtellier^a, C. Morinière^c, C. Marcaillou^d, S. Lemerle^c,
 A. Coutolleau^f, P. Reynier^{b,e}, P. Descamps^c, P. Guardiola^{f,g,h}

^a Laboratoire de biologie de la reproduction, centre hospitalier universitaire, 49933 Angers, France

^b UMR CNRS 6214, Inserm U771, 49933 Angers, France

^c Service de gynécologie-obstétrique, centre hospitalier universitaire, 49933 Angers, France

^d Integragen SA, 91000 Evry, France

^e Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, centre hospitalier universitaire, 49933 Angers, France

^f Plateforme SNP, transcriptome et épigénomique, centre hospitalier universitaire, 49933 Angers, France

^g Unité 892, centre de recherche sur le cancer Nantes-Angers et UMR_S 892, institut national de la santé et de la recherche médicale, université d'Angers, 49933 Angers, France

^h UMR_S 892, université d'Angers, Angers cedex 49933, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 14 juin 2012

Accepté le 30 juin 2012

Disponible sur Internet le 17 août 2012

Mots clés :

Corona radiata
 Cellules folliculeuses
 Expression génique
 Réserve ovarienne

Keywords:

Cumulus cells
 Gene expression profiling
 Diminished ovarian reserve

R É S U M É

Objectifs. – La diminution de la réserve ovarienne (DOR) est une cause courante d'infertilité. Nous avons cherché à définir les gènes dont l'expression par les cellules de la corona radiata (CCR) pourrait être spécifiquement dérégulée dans ce contexte.

Patients et méthodes. – Dans le cadre de fécondations in vitro, nous avons analysé, à l'aide de microarrays, le profil d'expression différentiel des CCR chez 4 patientes présentant une DOR et chez 4 patientes présentant une réserve ovarienne normale. L'expression des gènes d'intérêt a ensuite été étudiée sur un panel indépendant de 40 patientes, par RT-PCR quantitative.

Résultats. – Nous avons mis en évidence 48 transcrits différentiellement exprimés parmi lesquels, *CXXC5* et *FOXC1* sous-exprimés chez les patientes avec une DOR, et *CTGF*, *FSTL3*, *PTGS2* et *SOCS2* surexprimés dans ce groupe de patientes. Par ailleurs, deux sous-groupes ont été individualisés parmi les patientes présentant une DOR (DOR Gr1 et Gr2). Le groupe DOR Gr2 se caractérisait par une surexpression significative de *CITED2*, *CTGF*, *GAS-1*, *IRS2*, *PTGS2*, *SOCS2*, *VCAN* et une sous-expression significative de *CXXC5*, *FOXC1*, *GBP2* et *ZMIZ1*. Onze de ces gènes sont des cibles des oestrogènes et les autres patientes du groupe DOR2 présentaient un taux basal d'estradiol significativement plus élevé que les autres patientes du groupe DOR ($p < 0,006$).

Discussion et conclusion. – Nous avons identifié 12 gènes dérégulés dans les CCR de patientes présentant une DOR et potentiellement impliqués dans ce phénotype. La distinction d'un sous-groupe particulier de DOR évoque la possibilité d'une dérégulation des gènes de réponse aux oestrogènes.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

A B S T R A C T

Objectives. – Diminished ovarian reserve (DOR) is one of the causes of infertility. In this prospective study, gene expression profiling (GEP) of corona radiata cells (CRC) was performed to identify genes deregulated in DOR patients.

Patients and methods. – Microarray-based GEP of CRC isolated from eight women undergoing IVF was performed to identify genes differentially expressed between patients with normal ovarian reserve and DOR patients. Microfluidic-based quantitative RT-PCR assay were used to validate selected transcripts on 40 independent patients.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : PaMayPanloup@chu-angers.fr (P. May-Panloup).

Results. – Forty-eight transcripts were differentially expressed, including *CXXC5* and *FOXC1* down regulated in DOR, as well as *CTGF*, *FSTL3*, *PTGS2* and *SOC2* up regulated in DOR. According to these transcripts, two DOR patients' subgroups (DOR Gr1 and Gr2) were identified. In DOR Gr2 patients, *CITED2*, *CTGF*, *GAS-1*, *IRS2*, *PTGS2*, *SOC2*, *VCAN* were expressed at significantly higher levels, and *CXXC5*, *FOXC1*, *GBP2* and *ZMIZ1* at significantly lower level. Eleven of those genes are transcriptional targets of Estrogens and higher baseline oestradiol levels were observed in DOR Gr2 patients ($P < 0.006$).

Discussion and conclusion. – Twelve genes deregulated in CRC of DOR patients were identified, which could be involved in DOR pathogenesis. The distinction of a particular subgroup of DOR patients suggests the possibility of deregulation of estrogen response genes.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Au sein du follicule ovarien, un système de signalisation bidirectionnel entre l'ovocyte et les cellules qui l'entourent permet l'acquisition de la compétence ovocytaire. Les cellules folliculeuses supportent la croissance et la maturation ovocytaire par le biais de l'apport de nutriments et de facteurs de croissance. Inversement, l'ovocyte contrôle la différenciation, la prolifération et les fonctions des cellules folliculeuses via la sécrétion de facteurs paracrines appelés OSF (ovocyte-secreted factors), tels que GDF-9 (growth differentiation factor 9) et BMP-15 (bone morphogenetic protein 15) [1]. La corona radiata correspond à la première couche de cellules folliculeuses. Ces cellules sont en contact avec la zone pellucide et directement en reliées à l'ovocyte jusqu'à l'ovulation par le biais de projections transzonales. Du fait de ces relations étroites, les cellules de la corona radiata (CCR) ont pu être considérées comme des partenaires privilégiées de l'ovocyte, les plus soumises à l'action des OSF notamment [2].

La diminution de la réserve ovarienne (DOR) s'inscrit dans le cadre du vieillissement ovarien et est associée à une baisse de la qualité ovocytaire [3]. Sa prévalence est estimée à environ 10 % parmi les femmes infertiles [4]. Le trouble princeps responsable du déclin de la réserve ovarienne pourrait concerner l'ovocyte lui-même, son micro environnement, ou les deux. Quelle qu'en soit l'origine, notre hypothèse est que cette pathologie aura des répercussions sur le fonctionnement des cellules folliculeuses et particulièrement celles de la corona radiata.

Nous avons donc comparé le transcriptome des CCR chez des patientes prises en charge en fécondation in vitro et présentant soit une DOR, soit une réserve ovarienne normale (NOR). Et ce, dans le but d'appréhender les mécanismes moléculaires impliqués dans la diminution de la réserve ovarienne.

2. Patientes et méthodes

2.1. Caractéristiques des patientes

Les CCR ont été obtenues chez 48 patientes ayant bénéficié d'une FIV avec micro-injection au CHU d'Angers entre janvier et décembre 2010 (Tableau 1). Toutes avaient signé un consentement validé par le comité de protection des personnes (CB 2010-06). Vingt-quatre patientes considérées comme NOR présentaient un taux d'AMH sanguin supérieur à 2 ng/mL, un taux de FSH inférieur à 8 UI/L, un taux d'estradiol de moins de 60 pg/mL et un compte folliculaire antral supérieur à 4 par ovaire. Les 24 patientes considérées comme DOR avaient, soit une AMH inférieure à 2 ng/mL, soit un compte folliculaire antral de moins de 5 par ovaire. Quatre patientes de chaque groupe ont été retenues pour la réalisation des microarrays. La phase de validation a été réalisée chez les 20 autres patientes de chaque groupe. On ne notait aucune différence entre les 2 groupes en termes de type de stimulation (protocoles, FSH utilisées). Les patientes étaient ponctionnées par

voie transvaginale sous anesthésie générale, 36 heures après de déclenchement.

2.2. Isolement des cellules de la corona radiata

Pour chaque patiente, les complexes cumulo-ovocytaires étaient d'abord dissociés par action de la hyaluronidase (80 UI, Fertipro, Belgique) et mécaniquement à l'aide d'un stripper de 140 µm de diamètre. L'ovocyte et les CCR isolés étaient ensuite séparés par action mécanique à l'aide d'un stripper de 125 µm. L'ensemble des CCR d'une même patiente était centrifugé 10 mn à 2000 g et le culot congelé immédiatement dans l'azote liquide jusqu'à extraction.

2.3. Extraction d'ARN

Nous avons utilisé le kit NucleoSpin RNA XS (Macherey-nagel, Allemagne). L'ARN obtenu était quantifié (Nanodrop ND-1000) et qualifié (Bioanalyzer 2100 et RNA6000 Pico kit-Agilent, États-Unis).

2.4. Microarrays

La phase initiale d'amplification a été réalisée à l'aide du kit Illumina TotalPrep (Ambion, États-Unis) utilisant un seul cycle d'amplification. Le cRNA a ensuite été hybridé sur les puces d'expression HumanHT-12 v3 d'Illumina (comportant 48 803 sondes). La lecture utilisant un système I-Scan a été faite selon le protocole préconisé par Illumina.

2.5. RT-PCR quantitative

Dix-sept transcrits ont été validés, dont *POLR2A* utilisé comme gène de référence. La rétrotranscription de l'ARN de chaque échantillon a été faite à l'aide du kit Super Script Vilo (Invitrogen SARL, France). La PCR quantitative a été réalisée par méthode micro-fluidique sur le système Biomark (Fluidigm Europe B.V.).

2.6. Analyse des données

2.6.1. Microarrays

Le logiciel GenomeStudio 2010.3 (Illumina, États-Unis) et son module Gene Expression Analysis (v1.8.0) ont été utilisés pour l'extraction et la normalisation quantile des signaux. La clusterisation hiérarchique a été faite avec le logiciel Omics Explorer 2.2. Des *t*-tests classiques et Bayésiens régularisés (Cyber-T) ont été utilisés pour identifier les transcrits différenciellement exprimés ($p < 0,01$ considérée comme significative).

2.6.2. QPCR

Les valeurs des Ct obtenues à l'issue de la Q-PCR ont permis d'évaluer l'expression relative des gènes par la méthode des delta-delta de Ct [5]. L'analyse en composante principale a été réalisée à

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3948524>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3948524>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)