

Contribution of microRNAs in infertility

Apport des micro ARN dans l'infertilité

S. Aimeur¹, F. Manseur², Y. Krouk¹, M.S. Oukid¹

1. Clinique Hassiba Ben Bouali CHU Blida Faculté de médecine de Blida
2. EHS Tipaza

ABSTRACT

Micro RNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate gene expression. Many studies show that they are implicated in essential physiological functions and particularly in fertility. Specific alterations of miRNA expression have been identified directly involved in infertility, such as obesity and diabetes, Polycystic ovary syndrome (PCOS), premature ovarian failure and Endometriosis. they can be used as biomarkers and their possible use as diagnostic and prognostic markers of infertility.

KEY WORDS : infertility, micro RNAs; biomarkers.

RÉSUMÉ

Les micro-ARN (miARN) sont des petits ARN régulateurs de l'expression génique. De nombreux travaux ont montré leur implication dans des fonctions physiologiques cellulaires essentielles et en particulier dans la fertilité.

Les altérations d'expression de plusieurs miARN pourraient être impliquées dans les mécanismes d'infertilité tels que, l'obésité et le diabète, le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), l'insuffisance ovarienne prématurée et l'endométriose.

Ces molécules pourraient être utilisées comme de véritables biomarqueurs, ainsi que leur possible utilisation en tant qu'outils diagnostiques et du pronostic dans le domaine de l'infertilité.

MOTS CLÉ : infertilité, micro ARN, biomarqueurs

INTRODUCTION

Un des grands enjeux actuels dans le domaine thérapeutique médical, concerne le développement de nouvelles méthodes de diagnostic, notamment celles liées à l'utilisation des marqueurs biologiques. Parmi ces derniers, les mi-ARN suscitent beaucoup d'intérêts; particulièrement dans le domaine de l'infertilité où ils sont utiles comme moyens non invasifs pour détecter et suivre certaines pathologies et même de prévoir les résultats.

OBJECTIF : Montrer l'implication clinique des micro ARN dans le diagnostic et la prise en charge de l'infertilité.

GÉNÉRALITÉS : Les micro-ARN ont été découverts en 1993. Ce sont des petits ARN non codants, ils assurent la régulation post transcriptionnelle des gènes. Ils régulent, 30% du génome codant pour les protéines [1]. Ils contrôlent ainsi l'expression des gènes impliqués dans plusieurs processus biologiques (l'apoptose, la prolifération, la différenciation et la métastase). [1], [2]

Evolution des découvertes des micro-ARN

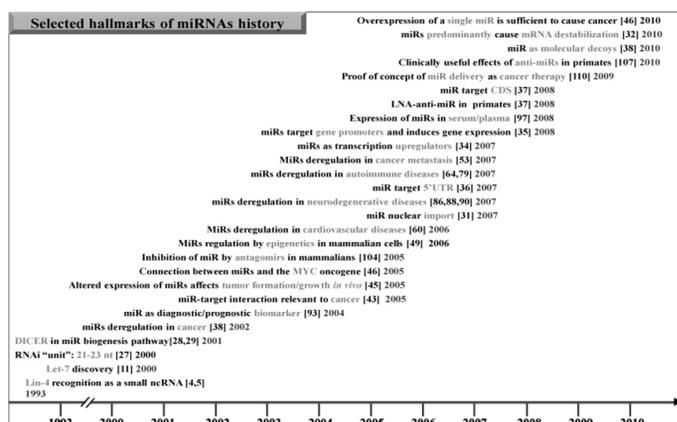


Figure 1 : Perspective historique sur l'évolution des connaissances sur miARN.

miR: microARN; UTR: région non traduite; CDS: séquences codantes; LNA:acide nucléique verrouillé

SYNTHÈSE DES MICRO-ARN : La synthèse commence dans le noyau, à partir de précurseurs.

Ces derniers, après plusieurs processus de maturation, ils sont transportés dans le cytoplasme par transport actif. [4]

Au niveau du cytoplasme les micro-ARN sont liés à des protéines qui vont les transporter vers leurs différentes cellules cibles. [4]

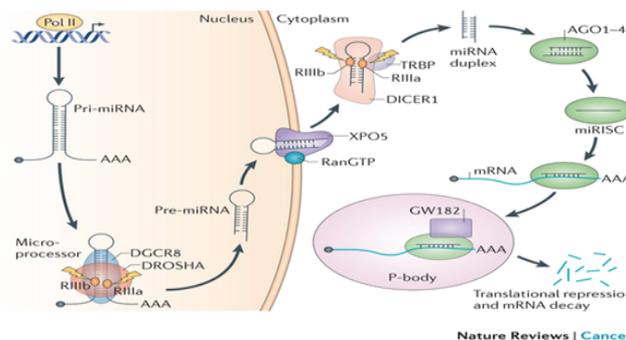


Figure 2 : biogenèse des micro ARN [6]

FONCTION DES MICRO-ARN : L'action principale des mi-ARN est l'inhibition de la synthèse des protéines en inhibant l'expression des gènes codants pour ces protéines, et ceci par inhibition de la traduction de l'ARNm ou la dégradation de celui-ci. [1, 7, 8]

Un seul mi-ARN peut réguler plusieurs ARNm et par conséquent l'expression des protéines correspondantes [9].

Certains mi-ARN sont spécifiques aux tissus, d'autres sont retrouvés dans plusieurs tissus différents. [10]

En plus de cette inhibition des ARNm, des études ont montré que les mi-ARN peuvent agir comme activateurs de la traduction des ARNm cibles. [3]

Selon que les mi-ARN soient surexprimés ou au contraire ayant une diminution de l'expression, on aura une modification du métabolisme cellulaire et tissulaire et l'apparition d'anomalies à l'origine de plusieurs pathologies [8].

TECHNIQUES D'IDENTIFICATION DES MI-ARN ET DE LEURS CIBLES

Ils sont identifiés à l'aide d'outils bio-informatiques et de séquençage génomique.

D'autres techniques d'analyse peuvent être utilisées comme : la PCR, la capture par des billes lumineuses, les puces à ADN, l'hybridation in situ et le séquençage direct.

Tableau1: Logiciels de prédiction des cibles de mi-ARN [8]

Tableau	Logiciels de prédiction de cibles microARN (non exhaustif).	Site internet
Logiciels de prédiction de cibles microARN		
RNAi web :	site regroupant un grand nombre d'adresses de sites de prédiction des microARN (RegRNA, miRacle, RNA22, RNAhybrid, miRU [plantes], miRBase)	http://www.rnaiweb.com
PicTar		http://www.pictar.mdc-berlin.de
MicroRNA.org (miRanda)		http://www.microna.org
DIANA-microT		http://www.diana.cslab.ece.ntua.gr/microT
TargetScanHuman		http://www.targetscan.org/
ProMir (Probabilistic miRNA prediction)		http://www.cbirt.snu.ac.kr/~ProMir2/introduction.html
MiRDeep (analyse de microARN dans le cadre des séquençages haut débit)		http://www.mdc-berlin.de/en/research/research_teams/systems_biology_of_gene_regulatory_elements/projects/mirDeep/
miRAlign		http://www.bioinfo.au.tsinghua.edu.cn/miralign/
miRtiff		http://www.mirtiff.bii.a-star.edu.sg/
TargetSpy		http://www.targetspy.org
Logiciels de localisation de cibles microARN sur un gène		
DIANA microTest		http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/micro.t.cgi
Patrocles (étude de polymorphismes)		http://www.patrocles.org
PolymIRTS		http://www.compbio.uthsc.edu/miRSNP/compare.php
dbSMR		http://www.miracle.igib.res.in/dbSMR
Bases de données de microARN expérimentalement prouvés		
TarBase		http://www.diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase
miRMAP		http://www.mirnapmap.mbc.nctu.edu.tw

Les mi-ARN : de bons marqueurs biologiques
Les miARN sécrétées ont beaucoup d'avantages, ce sont de bons marqueurs biologiques. Les mi-ARN sont stables dans différentes parties du corps (sérum, salive, urines). Les séquences de la plupart des mi-ARN sont conservées durant l'évolution des espèces. L'expression de certains mi-ARN est spécifique aux tissus ou aux stades biologiques. [13]

La première étude portant sur l'utilité des mi-ARN comme outils de diagnostic dans les fluides biologiques a été publiée en 2008 dans une étude qui détecte les miARN placentaires dans le sérum maternel [14].

La quantité des mi-ARN peut être facilement évaluée par diverses méthodes, y compris des procédés tels que la chaîne de la polymérase réaction (PCR), qui permet l'amplification du signal. [13]

Les changements des profils d'expression des miARN dans le plasma, le sérum, l'urine et la salive ont déjà été associés à différentes pathologies. [13]

MICRO ARN ET INFERTILITÉ

Expression anormale des mi-ARN dans le sang entrainera des troubles métaboliques tels que :

L'obésité et le diabète.

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK).

L'insuffisance ovarienne prématurée.

L'endométriase.

1. L' ENDOMÉTRIOSE: Bien que l'endométriase soit une maladie multifactorielle, les mi-ARN jouent le rôle de régulateurs d'expression des gènes impliqués dans son apparition ainsi que dans sa sévérité

Des études ont rapporté un profil d'expression différent de vingt-sept mi-ARN identifiés dans le sang de femmes souffrant d'endométriase par rapport à celui retrouvés chez des femmes en bonnes santé. [11]

miR-17-5p, miR-20a et miR-22 sont sous exprimés dans le sang des femmes atteintes d'endométriase. par contre il y'a une surexpression des miR-199a et miR-122 en cas d'endométriase. [11]

les miR-199a et miR-122 sont utilisés pour évaluer la sévérité de l'endométriase et ainsi suivre l'évolution de la maladie. [11]

2. LA RÉSERVE OVARIENNE: La prise en charge en AMP impose l'évaluation d'un certain nombre de paramètres. parmi eux la réserve ovarienne.

Jusqu'à ce jour, cette évaluation se fait par le de dosage du taux d'AMH couplé au compte des follicules antraux au 3^{ème} jour du cycle à l'aide d'une échographie endovaginale. [18, 19]

Une étude portant sur le profil d'expression de cinq mi-ARN. (miR-320a, miR-140, miR- 29a, miR-30a et let-7b) dans le liquide folliculaire et la possibilité de prédire les résultats en FIV, a comparé le liquide folliculaire de 91 femmes avec réserve ovarienne normale avec le liquide folliculaire de 30 femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), retrouve que le profil d'expression de ces micro ARN est différent entre les deux groupes de femmes avec une spécificité de 83.8% et une sensibilité de 70%. [20]

Aussi cette étude a retrouvé que dans les échantillons de liquide folliculaire comportant un faible taux d'ovocytes matures le jour de la ponction, il y'avait un faible taux d'expression du miR-320a [20]

Aussi dans cette étude on a retrouvé que le taux de let 7-b dans le liquide folliculaire prédit la capacité de développement du blastocyste une sensibilité de 70% et une spécificité de 64.5%. [20, 21]

Cette étude a montré aussi que le taux d'expression de miR29a dans le liquid folliculaire prédit le taux de grossesses cliniques avec une sensibilité de 83.3% et une spécificité de 53.5%. [20]

L'analyses des mi-ARN dans le sérum des femmes infertiles pourrait nous renseigner sur la réserve ovarienne. [11]

Ainsi ces micro ARN pourraient offrir un bon moyen pour personnaliser les protocoles en FIV et d'améliorer encore les résultats. [20]

3. SYNDROME DES OVAIRES POLY KYSTIQUES (SOPK): L'examen des cellules adipeuses de la graisse abdominale de 91 femmes atteintes de SOPK a retrouvé une surexpression du mir-93 et une diminution de l'expression de GLUT4 (principale protéine transporteur de glucose dans les cellules de l'organisme.) [12]

Les faibles taux de GLUT4 dans le tissu adipeux est lié à une insulino-résistance chez les femmes avec un syndrome des ovaires poly kystiques. [12]

Les chercheurs ont aussi découvert deux autres mi-ARN qui régulent l'expression de GLUT4 dans les cellules du muscle cardiaque : mir-133 et mi-r223. Ces derniers sont surexprimés dans les cellules des patientes atteintes de syndrome des ovaires polykystiques. [12] Des taux élevés de mir-93 dans les cellules adipeuses induit une insulino-résistance chez les patientes atteintes de syndromes de ovaires poly kystiques [12]

4. LA FOLLICULOGENÈSE Une folliculogenese correcte est nécessaire pour obtenir un ovocyte mature, qui une fois fécondé donne un embryon de bonne qualité aboutissant à une grossesse. Les mi-ARN en sont les principaux régulateurs. Ils sont exprimés dans le complexe cumulus-ovocyte des cellules de la granulosa, et certains d'entre eux peuvent être retrouvés dans le sang [11].

Plusieurs chercheurs étudient ces mi-ARN circulants afin de les utiliser comme marqueurs biologiques non invasifs pour le diagnostic et le pronostique de plusieurs troubles gynécologiques et pathologies de la grossesse. [11]

Une étude a montré qu'une dysfonction dans la biogenèse des mi-ARN par inactivation de la protéine DICER dans les cellules somatiques cause une infertilité féminine. [22]

Les gènes exprimés dans les ovaires jouent un grand rôle dans la folliculogenèse et la fécondation ainsi que le développement précoce de l'œuf. [23]

5. DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE: Au cours de ces dernières années, la découverte et la compréhension des mécanismes d'action des mi-ARN offre un moyen non invasif pour la détection des anomalies ovariennes, la capacité d'implantation de l'embryon ainsi que l'établissement d'un pronostic lors d'un suivi pour une FIV. [11] Aussi l'analyse du profil des mi-ARN dans le liquide de culture embryonnaire à J3, J5 ou J6 pourrait renseigner sur le développement embryonnaire et augmenter les chances d'implantation et de grossesse. [11]

Le transfert d'embryon unique est de plus en plus pratiqué en FIV pour réduire les complications liées aux grossesses multiples. Pour cela la sélection d'un ovocyte et d'un embryon de bonne qualité est essentielle pour améliorer les chances d'implantation de l'embryon et obtenir une grossesse.

Cette sélection est classiquement basée sur des critères morphologiques subjectifs. Récemment des études ont montré que cette sélection est possible par l'analyse du profil d'expression des gènes contenus dans les cellules du cumulus. Ce qui est une méthode non invasive qui reflète à qualité ovocytaire (dialogue cumulus-ovocyte) et embryonnaire, et ainsi prédire les résultats en FIV. [24]

Les mi-ARN sont impliqués dans la régulation du développement de l'embryon chez les mammifères. [25]

Le profil d'expression des mi-ARN indique que la synthèse et la dégradation des protéines coexistent aux stades précoces de développement de l'embryon. [26]

Aussi les mi-ARN pourraient moduler la différenciation des cellules souches embryonnaires humaines. [27]

De nombreux mi-ARN sont exprimés dans le développement des embryons de mammifères et CSEH, y compris miR-320, miR-92a, laissez-7a et miR-146b [26, 28]

D'autres études rapportent que la présence d'anomalies d'expression des mi-ARN dans l'embryon est associé à une infertilité humaine. [28]

Le profil d'expression des mi-ARN varie selon le sexe et les chromosomes. [29]

Comme les mi-ARN sont détectés dans les milieux de cultures des embryons en fécondation in vitro, leur analyse pourrait permettre de suivre leur développement durant la phase préimplantatoire afin de mieux les sélectionner, prédire le potentiel d'implantation afin d'améliorer les résultats en FIV. [11]

6. AVORTEMENTS PRÉCOCES: Des anomalies d'expression de plus d'une centaine de mi-ARN ont été retrouvées lors d'une étude, dans les placentas des produits de conception des avortements précoces.

Ceci suggèrent que le profil d'expression des mi-ARN dans les villosités chorales pourrait être lié aux avortements précoces à répétition. [30]

7. L'INFERTILITÉ MASCULINE: Une équipe de chercheurs à Nice ont mis en évidence que certains mi-ARN sont surexprimés dans des infertilités masculines. Ces mi- ARN régulent la spermatogenèse, ils conduisent les cellules germinales à l'apoptose. Donc ces travaux permettent d'aboutir à des tests de diagnostic d'infertilité. D'autre part cela permettrait d'élaborer des thérapies qui réduisent la surexpression de ces micro ARN et de traiter cette infertilité masculine. [15]

Dans une autre étude Wang et all ont identifié sept mi-ARN (miR-34c-5p, miR-122, miR-146b-5p, miR-181a, miR-374b, miR-509-5p, et miR-513a-5p) avec une expression nettement diminuée en cas d'azoospermie et une surexpression en cas d'asthénospermie. [16]

Dans une autre étude Wu et all ont montré une surexpression des miR-141, miR-429 et

miR-7-1-3p, chez des hommes atteints d'azoospermie non obstructive. Cependant l'échantillon pris dans cette étude n'étant pas important, d'autres études devraient encore être faites à plus grande échelle. [17]

Comme les taux des mi- ARN sont stables, avec des profils d'expression reproductibles, ils pourraient servir comme un bon moyen non invasif de diagnostic dans l'infertilité masculine. [16, 17]

CONCLUSION

Si certains résultats sont prometteurs sur le plan diagnostic et pronostic, la recherche se poursuit encore pour une meilleure application clinique de ces mi-ARN.

L'avancée d'un point de vue théorique est palpable, en espérant potentiellement une application thérapeutique ciblée et personnalisée.

BIBLIOGRAPHIE

1. Witold Filipowicz, Suwendra N. Bhattacharyya , and N. Sonenberg, Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nature Reviews Genetics* 9, 102-114, 2008. 9: p. 102-114.
2. D.P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004. 116(2): p.281-329.
3. Maria I. Almeida, Rui M. Reis, and G.A. Calin, MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research* 717 (2011) 1–8, 2011. 717: p. 1-8.
4. Minju Ha and V.N. Kim, Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014. 15: p. 509-524.
5. J. Lamoril a, P. Bouizegarène b, and M. Bogardc, Le monde complexe et mouvant des ARN. Seconde partie : les microARNs. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 2010. 25(5): p. 219-240.
6. Shuibin Lin and R.I. Gregory, MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2015. 15: p. 321-333.
7. M.R. Fabian, N. Sonenberg, and W.Filipowicz, Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem*, 2010. 79: p. 351-379.
8. S. Vasudevan, Y. Tong, and J.A. Steitz, Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 2007. 318:p. 1931-1934.
9. Esquela-Kerscher A and S. FJ., Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev*, 2006. 6: p. 259-269.
10. Reedy AM, et al., characterization and expression analysis of porcine microRNAs. . *BMC Genomics*, 2009. 10: p. 65.
11. S. Traver, et al., Cell-free nucleic acids as non-invasive biomarkers of gynecological cancers, ovarian, endometrial and obstetric disorders and fetal aneuploidy. *Human Reproduction Update*, 2014. 20(6): p. 905–923.
12. Chen YH, et al., miRNA-93 inhibits GLUT4 and is overexpressed in adipose tissue of polycystic ovary syndrome patients and women with insulin resistance. *Diabetes*, 2013. 62(7): p. 2278-2286.
13. Alton Etheridge, et al., Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutation Research* 2011. 717: p. 85-90.
14. S.S. Chim, et al., Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin. Chem*, 2008. 54(3): p. 482-490.
15. arcas, o.f.-. infertilité masculine : un simple test sanguin pour savoir ? information hospitalière Var *Matin inserm*, 2012.
16. Wang, C., et al., Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clinical Chemistry*, 2011. 57(12): p. 1722-1731.
17. W. Wu, et al., Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p *Hum Reprod*, 2013. 28: p. 1827-1836.
18. La Marca , et al., Possibilities and limits of ovarian reserve testing in ART. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2012. 13(3): p. 398-408.
19. Nelson, S.M., Biomarkers of ovarian response: current and future applications. *Fertil Steril*, 2013. 99: p. 963-969.
20. Scalici E, et al., Circulating microRNAs in follicular fluid, powerful tools to explore in vitro fertilization process. *Scientific Reports*, 2016.
21. Miles JR, et al., MicroRNA expression profile in bovine cumulus-oocyte complexes: possible role of let-7 and miR-106a in the development of bovine oocytes. *Anim Reprod Sci*, 2012. 130(1-2): p. 16-26.
22. Nagaraja AK, et al., Deletion of Dicer in somatic cells of the female reproductive tract causes sterility. *Mol Endocrinol*, 2008. 22(10): p. 2336-2352.
23. J., D., Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility and early mouse development. *J Reprod Immunol*, 2002. 53(1-2): p. 171-180.
24. Said Assou, et al., Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Molecular Human Reproduction*, 2010. 16(8): p. 531-538.
25. Foshay KM and G. GI, miR-17 family miRNAs are expressed during early mammalian development and regulate stem cell differentiation. *Developmental Biology*, 2009. 326: p. 431-443.
26. Yang Y, et al., Determination of microRNAs in mouse preimplantation embryos by microarray. *Dev Dyn*, 2008. 237: p. 2315-2327.
27. Wong SS, et al., miR-125b promotes early germ layer specification through Lin28/let-7d and preferential differentiation of mesoderm in human embryonic stem cells. *PLoS ONE*, 2012. 7(4): p. e36121.
28. McCallie B, Schoolcraft WB, and K.-J. MG., Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertil Steril*, 2010. 93: p. 2374-2382.
29. Rosenbluth EM, et al., MicroRNA expression in the human blastocyst. *Fertil Steril*, 2013. 99: p. 855-861.
30. Lisha Tang , et al., Expression profile of micro-RNAs and functional annotation analysis of their targets in human chorionic villi from early recurrent miscarriage. *Gene*, 2016. 576: p.366–371.