



**HAL**  
open science

# Recherche de biomarqueurs par approche métabolomique et cytokinique en assistance médicale à la procréation

Pierre-Emmanuel Bouet

► **To cite this version:**

Pierre-Emmanuel Bouet. Recherche de biomarqueurs par approche métabolomique et cytokinique en assistance médicale à la procréation. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2019. Français. NNT : 2019ANGE0077 . tel-03270937

**HAL Id: tel-03270937**

**<https://theses.hal.science/tel-03270937v1>**

Submitted on 25 Jun 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE DE DOCTORAT DE SCIENCES

UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 502

*Biologie Santé*

Spécialité : « *Biologie Moléculaire et Structurale, Biochimie* »

Par

**Pierre-Emmanuel BOUET**

**Recherche de biomarqueurs par approche métabolomique et  
cytokinique en assistance médicale à la procréation.**

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 19 Décembre 2019

Unité de recherche : Institut MITOVASC, UMR CNRS 6015, INSERM U1083

## Rapporteurs avant soutenance :

Blandine COURBIERE Professeur d'Université-Praticien  
Hospitalier, Université Aix-Marseille

Pietro SANTULLI Professeur d'Université-  
Praticien Hospitalier, Université Paris V

## Composition du Jury :

Hélène BLASCO Professeur d'Université-Praticien Hospitalier,  
Université Tours  
Présidente du Jury

Philippe DESCAMPS Professeur d'Université-Praticien  
Hospitalier, Université Angers  
Directeur de thèse

Pascal REYNIER Professeur d'Université-Praticien Hospitalier,  
Université Angers  
Co-directeur de thèse

Pascale MAY-PANLOUP Professeur d'Université-Praticien  
Hospitalier, Université d'Angers  
Co-encadrante

**L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :**  
**<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>**

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury :

Le Professeur Hélène Blasco qui me fait l'honneur de présider ce jury, veuillez recevoir le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

Le Professeur Philippe Descamps, merci à toi d'avoir accepté de co-diriger cette thèse. Cela fait maintenant quinze ans que tu guides ma carrière. Merci d'avoir toujours été là pour me motiver dans ce parcours semé d'embûches, merci pour ton soutien permanent, pour tes conseils toujours éclairés et pour m'avoir permis de connaître cette expérience formidable qu'est la mobilité. Merci d'avoir cru en moi. Merci de m'avoir donné l'envie de faire ce métier. Je tiens à te préciser que j'aurai encore besoin de tes précieux conseils dans les années à venir. Je te serai éternellement reconnaissant.

Le Professeur Pascale Reynier, je vous remercie d'avoir accepté de co-diriger cette thèse. Ce fut réellement un plaisir de travailler avec vous durant ces 3 années. Le fait de vous avoir rencontré a été déterminant dans mon choix de faire une thèse de science à une époque où j'étais quelque peu indécis. Merci d'avoir accepté d'adapter la thèse de science à mon activité hospitalière, merci pour votre disponibilité, votre écoute, vos conseils. Je n'ai plus qu'un souhait après cette thèse, continuer notre collaboration car c'est un réel plaisir de travailler à vos côtés.

Le Professeur Pascale May-Panloup, je te remercie d'avoir co-encadré cette thèse ou plutôt soyons honnête co-co-dirigé cette thèse voire fait ta 2<sup>ème</sup> thèse de science avec moi. Merci d'avoir joué un rôle fondamental dans mon parcours. J'aime venir travailler au quotidien, notre entente y est pour beaucoup. C'est un réel plaisir de co-diriger le service avec toi à la fois pour les activités cliniques mais aussi pour les travaux de recherche. Merci pour ton écoute, pour ton soutien, pour ta confiance, pour ton aide, pour ta sagesse et ton expérience. On va en avoir du pain sur la planche !

Les Professeurs Blandine Courbière et Pietro Santulli, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je vous ai sollicité car j'ai le plus profond respect pour vous à la fois sur le plan humain et professionnel et aussi parce que c'est toujours un réel plaisir de passer un peu de temps avec vous. J'espère que nous pourrons continuer à collaborer ensemble dans les années à venir. On va avoir de belles choses à accomplir ensemble pour notre spécialité, de beaux défis en perspectives. Sinon, je ne suis pas peu fier d'avoir réuni dans le même jury de thèse un Professeur parisien et un Professeur marseillais, sur terrain neutre quand même.

Je tiens aussi à remercier le Pr Daniel Henrion de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de l'institut MITOVASC (CNRS 6015-INSERM 1083).

Je remercie le Dr Juan Manuel Chao de la Barca. Merci Juan pour ta participation précieuse et indispensable à cette thèse. Merci pour ta disponibilité et ta gentillesse. Je t'avoue que malgré toute



ta bonne volonté, au risque de te décevoir, je crois que je ne suis pas vraiment fait pour les biostatistiques. Un grand merci aussi à Thomas Boueilh et Cinzia Bocca pour leur participation à ces travaux de thèse.

Merci à tous mes collègues pour votre soutien, vous m'avez toujours encouragé à me diriger vers la carrière universitaire. Merci d'avoir cru en moi. Merci aussi de m'avoir permis de consacrer du temps à tous mes travaux universitaires. Merci à Philippe, Guillaume, Laurent, Céline, Cécile, Pauline, Françoise, Florence, Sébastien, Marie et Catherine.

Merci à toute l'équipe d'AMP (cliniciens, biologistes, sages-femmes, secrétaires) pour votre soutien et vos encouragements : Agnès, Sandrine, Françoise, Natacha, Stéphanie, Véronique et Lisa notamment.

Merci aux Québécois qui ont joué un rôle capital dans mon cursus. Merci tout particulièrement à Roland, Camille, Louise, François, Bernard, Carole, Chloé. Merci de m'avoir donné confiance en moi, merci pour votre renforcement positif. C'est grâce à votre enseignement que l'assistance médicale à la procréation est devenue une vraie passion pour moi.

Un grand merci aux collègues qui sont aussi des amis aujourd'hui et qui ont joué un rôle crucial durant mon parcours. Merci Vanessa d'avoir toujours été à mes côtés durant l'internat et le clinicat, merci pour ton soutien sans faille. Merci Mathieu pour avoir bien égayé le clinicat, période parfois un peu difficile, merci pour tes conseils.

Un grand merci à mes co-fellows. Je remercie Jessica pour avoir pris sous son aile un petit Français perdu à Montréal. C'est toujours une joie de pouvoir se revoir chaque année en famille. Quelle belle amitié ! Je remercie aussi Hady « my evil twin ». Quel bonheur de t'avoir rencontré tant sur le plan personnel que professionnel. C'est toujours un plaisir de passer du temps ensemble à discuter du boulot, du foot, à refaire le monde. C'est vraiment trop loin Beyrouth !

Et enfin la famille. Merci à ma belle-famille, Fabien, Clara, Gérald et Laurette. Je vous remercie pour tous ces moments passés ensemble, merci de m'avoir accepté au sein de votre famille comme votre propre fils/frère.

Merci à mon frère et à ma sœur, Jean-Robert et Anne-Soazig, pour avoir toujours été là pour moi, merci pour votre soutien et vos encouragements. Merci également d'être de supers tonton et tata. Merci aussi à Julia et Carlos.

Un grand merci évidemment à mes parents pour votre soutien sans faille et votre amour inconditionnel. Je vous dois tout. Vous avez toujours été là pour moi, merci d'avoir toujours soutenu mes choix, merci de m'avoir éduqué ainsi et transmis vos valeurs, j'en ferai bon usage, je vous le promets.

Et je garde le meilleur pour la fin. Merci à ma femme, Flavie, qui a sacrifié tant de choses pour me permettre d'en arriver là. Merci pour ton amour, pour ta confiance. Si je me lève heureux le matin et me couche apaisé le soir c'est grâce à toi et à tout ce que tu fais pour rendre notre quotidien aussi merveilleux. Merci d'être une maman et une épouse formidable. Je t'aime tant.

Enfin, merci aux « jolies gentilles », mes 2 petites filles adorées, Annette et Amande. Je vous remercie de tout l'amour que vous me donnez au quotidien. Vous êtes la principale raison qui me pousse à me lever le matin (un peu trop tôt parfois !) et qui me rappelle de ne pas rentrer trop tard le soir. Je vous aime tellement mes poupées.

# Sommaire

## REMERCIEMENTS

## INTRODUCTION

## LA METABOLOMIQUE

1. **Approche métabolomique ciblée ou non ciblée**
2. **Les différentes techniques analytiques en métabolomique**
  - 2.1. La spectroscopie par RMN
  - 2.2. La spectrométrie de masse (*MS Mass spectrometry*)
    - 2.2.1. Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS)
    - 2.2.2. Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide (LC-MS)
3. **Déroulement d'une analyse métabolomique**
  - 3.1.1. Préparation des échantillons
  - 3.1.2. Techniques analytiques (RMN, MS)
  - 3.1.3. Traitement des données
  - 3.1.4. Analyses statistiques
    - a) Analyses univariées
    - a) Analyses multivariées

## L'ANALYSE METABOLOMIQUE DU FLUIDE FOLLICULAIRE (FF) ET DU PROFIL CYTOKINIQUE CHEZ DES FEMMES ATTEINTES D'ENDOMETRIOSE

1. **Recherche de biomarqueurs par analyse métabolomique ciblée du FF chez des femmes atteintes d'endométriose isolée**
2. **Recherche de biomarqueurs par analyse des cytokines dans le FF de femmes atteintes d'endométriose sévère**

## L'ANALYSE METABOLOMIQUE DU FLUIDE FOLLICULAIRE (FF) ET DU PROFIL CYTOKINIQUE CHEZ DES FEMMES AYANT UNE RESERVE OVARIENNE DIMINUEE

1. **Recherche de biomarqueurs par analyse métabolomique ciblée du FF chez des femmes ayant une réserve ovarienne diminuée**
2. **Recherche d'un profil cytokinique dans le FF de femmes ayant une réserve ovarienne diminuée**
  - 2.1. Introduction

## PERSPECTIVES : RECHERCHE PAR METABOLOMIQUE DE BIOMARQUEURS ENDOMETRIAUX DANS LES FAUSSES-COUCHES SPONTANEEES A REPETITION ET LES ECHECS D'IMPLANTATION REPETES APRES FIV, PROJET ENDOMETAB

1. **Contexte et justification de la recherche**
  - 1.1. Etat actuel des connaissances
  - 1.2. Hypothèses de la recherche
2. **Objectifs de la recherche et critères d'évaluation**
  - 2.1. Objectif et critère d'évaluation principal
  - 2.2. Objectifs et critères d'évaluation secondaires
3. **Conception de la recherche**
  - 3.1. Schéma de la recherche
  - 3.2. Justification du nombre de personnes à inclure dans la recherche
4. **Sélection des personnes de la recherche**
  - 4.1. Critères de sélection des patientes dans les groupes « cas » (déjà incluses dans la « collection fertilité »)
    - 4.1.1. Critères d'inclusion pour les cas
    - 4.1.2. Critères de non-inclusion pour les cas
  - 4.2. Critères de sélection des personnes qui se prêtent à la recherche (groupe « témoin »)
    - 4.2.1. Critères d'inclusion pour les témoins
    - 4.2.2. Critères de non-inclusion pour les témoins
5. **Prise en charge et traitements administrés aux personnes qui se prêtent à la recherche**
  - 5.1. Modalités de réalisation du prélèvement d'endomètre en pratique courante (groupe « cas »)
  - 5.2. Modalités de réalisation du prélèvement d'endomètre pour la recherche (groupe « témoins »)
  - 5.3. Prise en charge et traitements associés
6. **Déroulement de la recherche**
  - 6.1. Pré-sélection / Recrutement des patientes du groupe témoin

- 6.2. Procédure d'inclusion des patientes du groupe témoin
- 6.3. Suivi des personnes se prêtant à la recherche
- 6.4. Préparation et conservation des échantillons biologiques
- 6.5. Analyse métabolomique des échantillons biologiques
- 6.6. Durée de la recherche
- 7. Considérations éthiques et réglementaires**
- 7.1. Qualification de la recherche
- 7.2. Comité d'éthique et Autorité compétente

## **CONCLUSION**

## **BIBLIOGRAPHIE**

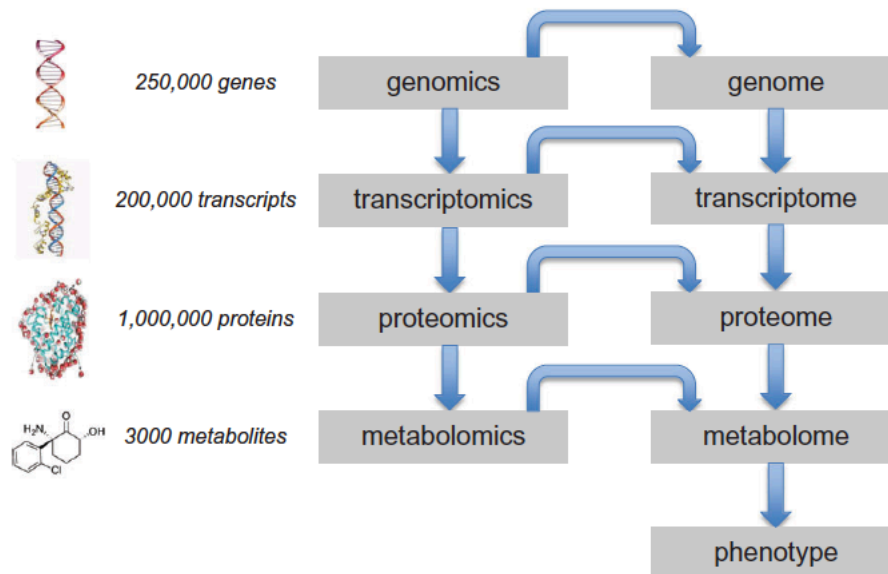
## Introduction

L'assistance médicale à la procréation (AMP) est un ensemble de pratiques cliniques et biologiques où la médecine intervient plus ou moins directement dans la procréation afin de permettre à des couples infertiles d'avoir un enfant. L'AMP est encadrée dans notre pays par la loi de bioéthique du 6 août 2004, dispositions qui ont été révisées par la loi du 7 juillet 2011 (1). En France, en 2018, une naissance sur trente (soit 3.4%) était issue de l'AMP (2).

Depuis les années 2000, l'émergence des technologies omiques, a permis d'appréhender les phénomènes biologiques de manière globale. La possibilité d'avoir une vision d'ensemble qualitative, quantitative et même fonctionnelle d'un système biologique a conduit à envisager une amélioration voire une personnalisation de la prise en charge des couples en en AMP. La métabolomique, est la technique omique développée le plus récemment. Elle étudie le métabolome, qui regroupe l'ensemble des métabolites présents dans un échantillon biologique (3).

La métabolomique est définie comme l'étude de l'ensemble des petites molécules organiques du métabolisme (<1500 Da) (4). Le métabolome humain comprend actuellement plus de 114000 métabolites incluant les peptides, les lipides, les acides aminés, les acides nucléiques, les xénobiotiques, les acides organiques, les vitamines ainsi que toute autre molécule endogène ou exogène (5). La métabolomique peut être considérée comme le point final de la cascade des « omics ». En effet, afin de comprendre la fonction des gènes, la majorité des études de génomique fonctionnelle sont actuellement basées sur l'analyse de l'expression génique avec la transcriptomique (études des ARN messagers ou autres types d'ARN) et l'analyse complète des protéines avec la protéomique (6). Le dernier niveau d'exploration est l'étude des métabolites avec la métabolomique. Ces métabolites sont le reflet des facteurs génétiques et environnementaux qui agissent sur un individu et signent son phénotype (Figure 1).

Figure 1. La cascade « omics » décrit le flux des informations biologiques intervenant dans un organisme (7).



La métabolomique est un outil permettant d'appréhender les mécanismes physiopathologiques, et potentiellement d'identifier de nouveaux biomarqueurs spécifiques.

Un biomarqueur est une caractéristique biologique mesurable pouvant être l'indicateur d'un processus normal ou pathologique, ou d'une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique. Dans le domaine médical, un biomarqueur peut être utilisé pour le dépistage médical (antigène prostatique spécifique et cancer de la prostate), le diagnostic (glycémie à jeûn et diabète), la réponse à un traitement médical ou la rechute après un traitement (marqueur tumoral CA-125 et cancer de l'ovaire) ou encore pour évaluer la toxicité d'une molécule (interaction bisphénol A-placenta). Il existe de nombreux intérêts à rechercher de potentiels biomarqueurs en AMP par approche métabolomique :

- Pour améliorer la compréhension de mécanismes biologiques complexes pouvant intervenir, par exemple, lors de la fécondation ou de l'implantation embryonnaire (8).
- Pour permettre une meilleure évaluation de la qualité gamétique (spermatique ou ovocytaire) afin de mieux prédire la qualité embryonnaire (8).

- Pour déterminer les mécanismes physiopathologiques à l'origine d'une infertilité, par exemple en cas d'endométriose, de réserve ovarienne diminuée, d'échecs d'implantation répétés ou de fausses couches à répétition.
- Pour diagnostiquer précocement et de manière peu invasive (prise de sang) une pathologie pouvant être à risque d'infertilité (une endométriose par exemple).
- Pour aboutir à la découverte de nouvelles thérapeutiques grâce à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'infertilité.
- Pour améliorer les résultats des techniques d'AMP et notamment en fécondation in vitro (FIV) associée ou non à une injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI). En effet, les taux de naissances vivantes restent les mêmes depuis 10 ans autour de 20 à 25%.

Nous nous sommes intéressés à 4 pathologies rencontrées fréquemment en gynécologie et plus spécifiquement en médecine de la reproduction : l'endométriose, la diminution de la réserve ovarienne attestant du vieillissement ovarien aussi appelé par les anglo-saxons « ovarian aging », les échecs d'implantation répétés et enfin les fausses couches à répétition.

L'endométriose est une maladie gynécologique chronique et multifactorielle caractérisées par la présence de tissu endométrial (glandes endométriales et stroma), aussi appelé tissu utérin, en dehors de la cavité utérine (9). Ce tissu crée des lésions hormono-dépendantes responsables d'une inflammation chez la femme en période d'activité génitale pouvant provoquer des dyspareunies profondes, des dysménorrhées intenses, des troubles digestifs et/ou urinaires et une infertilité. On estime la prévalence à 10% des femmes en âge de procréer et à un tiers des femmes de 16 à 50 ans souffrant de douleurs menstruelles aiguës (9). Le diagnostic de l'endométriose est difficile et renforcé par la banalisation des symptômes et la méconnaissance de cette maladie par le grand public et les soignants. En conséquence, il existe un délai moyen de 7 ans entre l'apparition des 1ers symptômes et le diagnostic de la maladie (10).

L'ovaire contient un stock maximum d'ovocytes présent dès la vie intra-utérine. Ces ovocytes sont soumis à un intense phénomène d'apoptose. En effet, le nombre maximal d'ovocytes est obtenu dès 20 semaines de grossesse et il est alors d'environ 7 millions (11). A la naissance, le nombre d'ovocytes est de 1 à 2

millions et ne serait plus que de 400000 à la puberté. Seuls 400 à 500 d'entre eux seront ovulés au cours de la vie génitale de la femme. La déplétion folliculaire s'accélère vers l'âge de 37 ans et la ménopause survient lorsque le nombre de follicules est inférieur à 1000 (11). Le vieillissement ovarien résulte à la fois d'un déclin qualitatif mais aussi quantitatif de la réserve ovarienne (12). Cliniquement, le vieillissement ovarien est caractérisé par une réserve ovarienne diminuée (ROD) objectivée par des marqueurs tels que la diminution de l'AMH, l'élévation de la FSH et la diminution du CFA.

L'implantation embryonnaire est un processus complexe au cours duquel l'embryon humain s'appose d'abord à l'endomètre maternel, y adhère puis finalement y pénètre et l'envahit. Alors que l'implantation peut se produire dans n'importe quel tissu du corps humain, l'endomètre est pratiquement le seul tissu dans lequel l'embryon ne peut pas s'implanter excepté pendant une période très limitée appelée fenêtre implantatoire. L'European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) a proposé en 2005 comme définition des échecs d'implantation répétés (EIR) le seuil de 3 tentatives avec transfert d'embryon de bonne qualité, ou au moins 10 embryons transférés frais ou congelés sans l'obtention d'une grossesse à l'échographie réalisée 5 semaines après le transfert d'embryon (13). L'une des définitions la plus couramment utilisée et plus récente est celle issue de la revue de la littérature réalisée par Coughlan *et al* (14). Les auteurs définissaient les EIR comme l'échec de l'obtention d'une grossesse clinique (activité cardiaque constatée à l'échographie de datation vers 6-7 semaines d'aménorrhée) après au moins 3 transferts différents comportant au total au moins 4 embryons de bonne qualité (frais ou congelés) chez des femmes de moins de 40 ans. La prévalence des couples pris en charge en FIV et confrontés à des EIR est d'environ 15-20% (FIV) (15).

Les fausses-couches spontanées à répétition (FCSR) sont définies quant à elle par les sociétés savantes européenne, britannique et française (16-18) comme un antécédent de 3 FCS consécutives étant survenues avant 14 semaines d'aménorrhée et pouvant inclure des fausses-couches non visualisées à l'échographie. Les FCSR touchent environ 2 à 5% des couples ayant un désir de grossesse (18-19).

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse se sont donc portés sur 3 axes :



1. L'analyse métabolomique et l'étude du profil cytokinique dans le fluide folliculaire de patientes atteintes d'endométriose.
2. L'analyse métabolomique et l'étude du profil cytokinique dans le fluide folliculaire de patientes ayant une réserve ovarienne diminuée.
3. L'analyse métabolomique de l'endomètre de patientes atteintes d'échecs d'implantation répétés après FIV-ICSI ou de fausses-couches à répétition.

# La métabolomique

## 1. Approche métabolomique ciblée ou non ciblée

L'approche métabolomique ciblée porte sur l'identification précise et la quantification ou semi-quantification d'un ensemble défini de métabolites dans des échantillons biologiques. Cette approche se focalise sur une ou plusieurs voies métaboliques spécifiques ou des métabolites appartenant à une famille chimique donnée. Ce type d'étude peut être réalisé en complément d'une étude non ciblée pour répondre à une hypothèse biochimique.

L'analyse non ciblée, quant à elle, cherche à obtenir le plus grand nombre possible de métabolites provenant d'une diversité de classes chimiques et biologiques contenues dans un échantillon.

Les analyses métabolomiques peuvent être réparties également en analyse discriminatoire et en analyse informative. L'analyse discriminatoire a pour but de rechercher des différences discriminantes entre deux ou plusieurs échantillons en fonction de leurs caractéristiques métabolomiques. L'analyse informative permet d'identifier le métabolome dans le but d'obtenir des informations concernant la composition de l'échantillon.

## 2. Les différentes techniques analytiques en métabolomique

A ce jour, le métabolome humain n'est pas totalement identifié. Une base de données telle que *Human Metabolome DataBase* (HMDB) contient des informations sur les métabolites humains ainsi que sur leurs rôles biologiques, leurs associations avec certaines maladies, leurs réactions chimiques et les voies métaboliques (5). Par rapport à la version précédente de HMDB (HMDB 3.0), la nouvelle version (HMDB 4.0) a considérablement augmenté le nombre de métabolites en passant de 40153 à 114100 métabolites identifiés (5). En effet, de nombreuses techniques analytiques, reposant principalement sur la spectrométrie de masse (MS) et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), sont utilisées pour détecter et quantifier les métabolites, de manière de plus en plus sensible et spécifique.

## 2.1. La spectroscopie par RMN

Dans le cadre de l'analyse du métabolome, la RMN présente un certain nombre d'avantages car la technique nécessite peu ou pas de préparation de l'échantillon. Cette technique est donc rapide, non destructive, simple à mettre en œuvre, robuste et reproductible. Cependant, elle reste une méthode peu sensible nécessitant une plus grande quantité d'échantillon par comparaison avec la spectrométrie de masse (20). Le principe de la RMN consiste en une analyse des noyaux de spins nucléaires non nuls. En effet, un grand nombre de noyaux peut être observé en RMN tels que  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ... La RMN unidimensionnelle (1D)  $^1\text{H}$  RMN est l'approche par RMN la plus utilisée en métabolomique, du fait de la présence universelle d'hydrogène dans les biomolécules (21). Cependant, en RMN 1D, le chevauchement des signaux peut s'avérer délicat et rend l'identification des composants parfois difficile. Afin de surmonter ce problème, la RMN bidimensionnelle (2D) offre une approche améliorée pour l'identification non ambiguë des métabolites dans les mélanges. En effet, elle permet la séparation des métabolites grâce à la 2<sup>ème</sup> dimension, ce qui permet de disperser les signaux et de faciliter de ce fait leur identification. Les méthodes 2D incluent les interactions  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et celles qui mesurent les interactions  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Les séquences COSY (spectroscopie corrélée) et TOCSY (spectroscopie de corrélation totale) détectant les interactions  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  sont régulièrement utilisées (21). Les séquences utilisant des interactions hétéronucléaires comme  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) ou  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) sont de plus en plus utilisées en métabolomique. En effet, les signaux de  $^{13}\text{C}$ -RMN couvrent une largeur spectrale de 200 parties par millions (ppm) comparée à 10 ppm pour  $^1\text{H}$  et sont donc plus résolutifs, ce qui permet d'étaler et de résoudre les pics sur la 2<sup>ème</sup> dimension.

## 2.2. La spectrométrie de masse (MS *Mass spectrometry*)

La spectrométrie de masse regroupe un ensemble de techniques d'analyse permettant la mesure de molécules après leur ionisation et en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Les ions formés sont alors séparés. La spectrométrie de masse est de plus en plus utilisée en métabolomique car en plus de sa sensibilité supérieure à celle de la RMN, elle offre la possibilité de couplage à un système chromatographique permettant la séparation préalable des molécules et ainsi d'augmenter la résolution des

ions détectés. Plusieurs systèmes de séparation sont utilisés : la chromatographie gazeuse (GC), la chromatographie liquide (LC) et l'électrophorèse capillaire.

### 2.2.1. Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS)

La chromatographie en phase gazeuse est une technique de grande sensibilité et de résolution élevée. Cependant, cette méthode se limite à l'étude des composés sous forme gazeuse. Il est souvent nécessaire d'effectuer une étape de modification chimique afin d'améliorer la volatilité des composés polaires ou peu volatiles. Ce traitement de l'échantillon est long et peut conduire à des réactions de dégradation.

### 2.2.2. Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide (LC-MS)

Actuellement, la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide (LC-MS) est la technique la plus utilisée pour analyser le métabolome du fait des nombreux types de colonnes existant et permettant de couvrir une large gamme de métabolites. Contrairement à la GC-MS, elle peut être appliquée à l'analyse de composés non volatiles. Cette technique peut permettre d'une part d'obtenir la masse moléculaire d'un métabolite et d'autre part de détecter les produits de fragmentation de l'ion moléculaire, permettant ainsi d'analyser les molécules de manière très spécifique. En outre, certains spectromètres de masse à haute résolution ont des seuils de sensibilité de l'ordre de la pmol/L, permettant ainsi l'exploration d'une très large gamme de concentrations (de la pmol/L à mmol/L, c'est-à-dire des concentrations s'étalant sur une échelle de  $10^9$  fois). En chromatographie liquide, il existe des systèmes chromatographiques à haute pression (HPLC, *High Pressure Liquid Chromatography*) et à ultra-haute pression (UHPLC, *Ultra High Pressure Liquid Chromatography*).

Les travaux d'analyse métabolomique qui ont été faits lors de cette thèse ont utilisé deux spectromètres de masse couplés à la chromatographie en phase liquide (QTRAP 5500 mass spectrometer, SCIEX et ThermoScientific Q Exactive mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific).

Nous avons profité de l'opportunité du multiplexage des dosages de cytokines mis en place par nos collègues immunologistes par la technique « *multiplex fluorescent-bead-based technology Luminex 200™, Austin, TX* » pour compléter l'étude de nos cohortes.

## 3. Déroutement d'une analyse métabolomique

### 3.1.1. Préparation des échantillons

La 1<sup>ère</sup> étape d'une approche métabolomique correspond au choix du milieu et à la préparation de l'échantillon afin d'éviter toute source de variabilité externe et notamment la perte d'information. Cependant, de nombreux facteurs peuvent influencer le métabolome humain : l'âge (22), le sexe (23), la nutrition (24) et la microflore intestinale (25). Certains de ces facteurs confondant tels que la nutrition ou la flore intestinale ne sont pas facilement contrôlables. Il faut bien noter qu'aucune analyse statistique, aussi performante soit-elle, ne peut rattraper les erreurs commises lors de cette étape initiale de préparation des échantillons.

Un échantillon biologique est donc prélevé chez  $n$  sujets. Dans chacun des  $n$  échantillons correspondants,  $k$  variables sont détectées (pics chromatographiques en spectrométrie de masse). Généralement  $k \gg n$ , ce qui distingue les approches de types « omiques » des approches plus ciblées. Le degré de connaissance sur les  $k$  variables varie au fur et à mesure que l'analyse métabolomique se déroule.

Afin de limiter ces variations susceptibles de masquer la signature d'un phénomène physiopathologique donné, il est important en recherche clinique de limiter ces variations interindividuelles par la constitution de groupes homogènes de patients (âge, sexe, groupe de pathologies,) et d'effectuer les prélèvements de la manière la plus homogène possible (patient à jeun, prélèvements aux mêmes horaires pour limiter les variations nyctémérales, matériels de prélèvements identiques).

Une autre caractéristique très importante de cette étape pré-analytique est de limiter la poursuite du métabolisme une fois le prélèvement réalisé. Cette étape de « quenching » permettant de figer le métabolisme, et donc de préserver les signatures métaboliques originales, consiste le plus souvent à transporter les échantillons dans la glace avant de les congeler rapidement à  $-80^{\circ}\text{C}$  sous la forme d'aliquots afin d'éviter les cycles de congélation/décongélation qui altèrent le métabolome.

### 3.1.2. Techniques analytiques (RMN, MS)

La 2<sup>ème</sup> étape correspond donc à la production de données métabolomiques brutes obtenues (spectres, chromatogramme) par les différentes techniques analytiques disponibles (RMN, MS).

En spectrométrie de masse, le degré de connaissance sur les  $k$  variables varie au fur et à mesure que l'analyse métabolomique se déroule : initialement on ne peut parler effectivement que de pics chromatographiques (ou *features* en anglais) des données brutes caractérisées par 3 dimensions : le rapport  $m/z$ , l'intensité du signal et le temps de rétention. Ces données brutes doivent être traitées par des logiciels dédiés pour identifier les molécules correspondantes.

### 3.1.3. Traitement des données

Le traitement des données brutes a pour principe d'extraire le signal pertinent, d'éliminer le bruit de fond et de convertir les signaux sous un format numérique grâce à l'utilisation de logiciels spécifiques. Il existe différents logiciels libres ou commerciaux qui assurent la détection automatique des signaux. Les signaux détectés sont ensuite restitués sous une forme de tableau de données compatibles avec les logiciels d'analyse statistique : chaque ligne représente une variable (un signal), qui est caractérisée par son temps de rétention (TR) et son rapport masse/charge ( $m/z$ ) pour la MS ou son déplacement chimique en ppm pour la RMN et chaque colonne correspond à un échantillon donné. Le tableau est alors rempli par les intensités ou les aires de pics chromatographiques ou spectraux de chaque variable dans un échantillon donné.

En RMN, différentes méthodes de traitement de données sont disponibles. En général, les positions des signaux RMN peuvent varier d'un échantillon à l'autre en raison des différences de pH, de la force ionique ou encore de la température. En RMN 1D, un traitement des données peut consister à découper manuellement l'ensemble des spectres après leur superposition. Cette stratégie va permettre de sélectionner des bandes spectrales qui correspondent aux métabolites d'intérêts. Le découpage donne des zones spectrales « buckets » de taille variable (26). Des problèmes peuvent être causés dans le cas des échantillons complexes comme c'est le cas des urines ou du plasma à cause des différences de pH ou de force ionique, ce qui rend difficile ce découpage.

Un autre traitement des données consiste à découper de manière automatique les spectres en « buckets » soit de taille fixe (par exemple 4 ppm) soit de tailles variables.

En RMN 2D, les logiciels adaptés permettent l'intégration de l'aire des tâches de corrélation. Le triméthylsilylpropionate (TSP) est généralement utilisé afin de calibrer les déplacements chimiques.

Pour le traitement des données obtenus par LC-MS, les logiciels gratuits de type XCMS sont les plus couramment utilisés. Les fichiers LC-MS sont tout d'abord convertis au format adapté par le logiciel (par exemple mzXML pour le logiciel XCMS). L'analyse XCMS consiste à détecter tous les rapports m/z avec les temps de rétention associés pour chaque échantillon et à corriger les écarts du temps de rétention pour les échantillons.

Un autre point dans le traitement des données est la normalisation. En effet, les données métabolomiques sont sujettes à des variations et des biais techniques et/ou biologiques indésirables (26). Ces variations peuvent résulter de différents facteurs tels que la collecte des échantillons, le stockage et la préparation des échantillons ainsi que les performances du spectromètre sur l'ensemble des échantillons étudiés. L'objectif de la normalisation des données en métabolomique consiste à minimiser la variance technique et biologique indésirable entre les échantillons. Cependant, aucune méthode de normalisation ne permet d'éliminer à 100% la variabilité analytique tout en préservant la variabilité biologique.

En RMN, parmi les méthodes de normalisation, la normalisation par quotient probabiliste a été développée afin de pallier les effets de dilution dans les fluides biologiques. Son principe se base sur la normalisation de chaque spectre par son intensité totale d'abord, puis en prenant le spectre médian comme spectre de référence. Ensuite l'aire de chaque pic du spectre est divisée par l'aire du pic correspondant du spectre de référence. En RMN, les pics sont souvent normalisés par rapport à un standard externe de concentration connue comme le TSP ou à une molécule interne comme la créatinine ou par l'aire totale du spectre.

En LC-MS, il est essentiel de corriger les fluctuations des signaux provenant des effets de suppression d'ions et qui peuvent entraîner des diminutions de l'intensité du signal au sein d'une même analyse et par la suite causer des problèmes au niveau de l'interprétation des données. L'ajout des étalons internes dans tous les échantillons ainsi que l'utilisation de contrôle qualité (QC) permettent de corriger ces fluctuations des signaux. La normalisation par les standards internes ou externes est couramment utilisée en métabolomique. Cependant, cette méthode de normalisation n'est pas parfaite. En effet, il existe des

métabolites qui peuvent être élués en même temps que les standards et qui peuvent par la suite influencer leur ionisation à cause des phénomènes de suppression d'ions. D'autres méthodes de normalisation existent telles que la normalisation à l'aire totale ou encore la médiane de l'intensité du métabolite.

#### 3.1.4. Analyses statistiques

Après normalisation des données, on effectue une analyse statistique des résultats afin de regrouper et représenter visuellement les données en fonction de critères de similitude et de ressortir des profils métaboliques pertinents. Il existe 2 types d'analyses statistiques utilisées : univariée et multivariée.

##### a) Analyses univariées

Les analyses statistiques univariées vont permettre d'analyser une à une les variables explicatives sans tenir compte des interactions qui existent entre les variables en les comparant par des tests statistiques de comparaisons de moyennes paramétriques ou non paramétriques. Les analyses univariées dans les études métabolomiques sont souvent réalisées en complément des analyses multivariées afin d'analyser individuellement les métabolites discriminants identifiés dans les analyses multivariées. De plus, ces analyses permettent de définir une liste de métabolites significativement modifiés et d'identifier les voies métaboliques associées afin d'émettre des hypothèses aidant à la compréhension physiopathologique. Le problème de ces études est la répétition des tests statistiques qu'il faut corriger par des modifications des seuils de significativité (27).

##### a) Analyses multivariées

Contrairement aux analyses univariées, les analyses multivariées sont utilisées afin de gérer et d'interpréter le grand nombre de signaux (métabolites) détectés en métabolomique, dans le but de révéler les empreintes métabolomiques discriminantes entre plusieurs conditions. Elles permettent de visualiser une grande quantité d'informations, en projetant les données initiales (individus et variables) dans un espace de dimensions réduites. Les outils de statistiques multivariées peuvent être divisées en deux : les analyses statistiques non supervisées et supervisées.



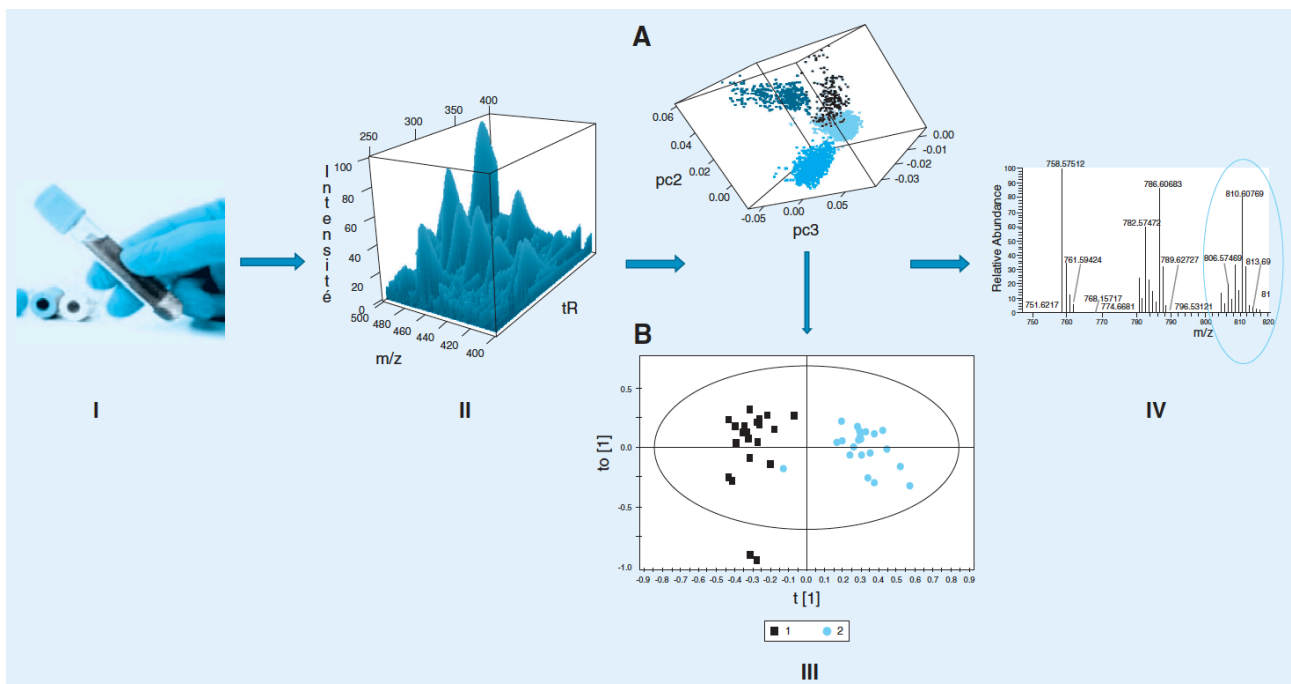
L'analyse en composantes principales (ACP) est la plus utilisée des analyses multivariées non supervisées. L'objectif est d'obtenir une vision globale des données, sans aucun a priori. C'est une méthode statistique descriptive qui repose sur l'identification des différences et ressemblances entre les différents types d'échantillons. La répartition de ces derniers dans l'espace de la représentation graphique permet de révéler des regroupements ou *clusters*, et des échantillons aberrants ou *outliers*. Ces derniers pourront être écartés des analyses statistiques après consultation des métadonnées avec le biologiste ou le clinicien.

Parmi les méthodes statistiques multivariées supervisées, la plus courante est la méthode de régression des moindres carrés partiels (Partial Least Squares, PLS) (28). C'est une méthode statistique explicative qui permet d'apporter une ou plusieurs informations Y en fonction des variables X. L'analyse discriminante (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) est une analyse qui est généralement réalisée après la PLS. Ces méthodes sont plus puissantes que la méthode non supervisée car elles prennent en compte l'information de la variable réponse dans la construction et la validation des modèles. Elle a pour but de décrire de manière optimale l'appartenance des groupes prédéfinis d'individus Y (malades versus sains par exemple) à partir de variables prédictives X. Contrairement à l'ACP, cette méthode permet de mettre en évidence les variables discriminantes entre les groupes. Afin de faciliter l'interprétation des résultats ainsi que leur visualisation, il existe une méthode de filtrage des données par correction orthogonale du signal (Orthogonal Signal Correction, OSC) qui peut être utilisée pour exclure les variables X qui ne sont pas corrélées aux variables Y. Cette méthode de correction orthogonale (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA) génère un score plot permettant la visualisation de la séparation des 2 groupes. La qualité des modèles est définie par 3 paramètres : la variation modélisée cumulative (cum) de la matrice X dite  $R^2X$ , la variation modélisée cumulative de la matrice Y dite  $R^2Y$ , cette dernière étant la proportion de variance des données expliquées par les modèles indiquant la qualité de l'ajustement et enfin la capacité prédictive de la validation croisée  $Q^2(\text{cum})$  (29).

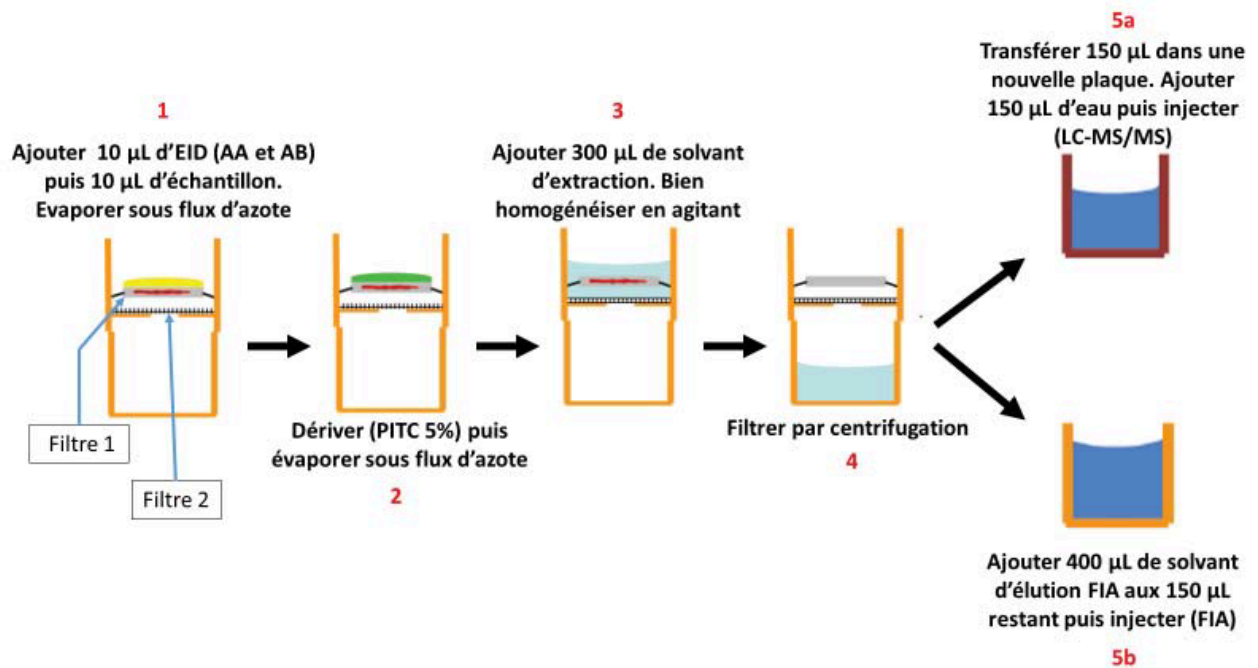
Le résultat de l'analyse statistique est donc d'identifier les variables (*features*) qui ont le plus d'influence dans la séparation des groupes.

La dernière étape de l'analyse en spectrométrie de masse est donc l'identification chimique des pics chromatographiques ou « features ». Deux informations permettent d'approcher l'identification des métabolites : le rapport  $m/z$  et le massif isotopique. En général, plus la masse est obtenue avec précision, plus la liste potentielle des métabolites est réduite. Dans ce contexte, les spectromètres de haute résolution en masse comme l'OrbiTrap ou le FT-ICR MS s'avèrent utiles (29).

**Figure 2.** Etapes de l'analyse métabolomique en approche non ciblée. Après la préparation des échantillons (I) et l'injection dans le système LC-MS, k pics chromatographiques sont obtenus (II). Ils sont dotés de 3 dimensions (temps de rétention ou tR, m/z et intensité). Après traitement du chromatogramme brut (correction du bruit de fond, élimination des adduits, etc...) les k2 pics restants sont soumis à une analyse statistique multivariée non supervisée comme le PCA (III A), puis supervisée (ex : OPLS-DA, III B). Les pics ou features qui permettent la séparation des groupes sont finalement identifiés (IV) (29).



**Figure 3.** Etapes dans la préparation des extraits avant leur injection dans le spectromètre de masse. Les étalons internes deutérés (EID) des acides aminés (AA) et amines biogènes (AB) sont ajoutés d'abord au filtre 1, les EID de la méthode FIA sont déjà incorporés dans ce filtre. Après dérivation avec le phénylthiocyanate (PITC) et mise en solution avec le solvant, 150 microlitres sont prélevés et transférés dans une 2<sup>ème</sup> plaque à 96 puits pour la chromatographie (5a). On ajoute du solvant d'élution FIA aux 150 microlitres restant avant d'injecter directement dans le spectromètre de masse (5b).



**Figure 3.** Plan de la plaque du kit AbsoluteIDQ p180 utilisé pour les analyses métabolomiques ciblées. La plaque est composée de 96 puits pour 1 blanc (B), 3 zéros (Z-1 à Z-3), 7 niveaux de calibrants (C-1 à C-7), 3 niveaux de contrôle qualité (QC-1 à QC-3) et de 79 à 82 échantillons ( $E_1, \dots, E_n$ ) en fonction du nombre de puits qu'on destine aux QC.

Well	1180 Cal5	G 1 subject 3	G 1 subject 1	G 1 subject 2	G 2 subject 1	G 2 subject 2	G 2 subject 3	G 2 subject 4	G 2 subject 5	G 2 subject 6	G 2 subject 7	G 2 subject 8	G 2 subject 9	G 2 subject 10	G 2 subject 11	G 2 subject 12
<b>B</b>	<b>C-5</b>	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12					
<b>Z-1</b>	<b>C-6</b>	13	14	15	<b>QC-2</b>	17	18	19	20	21	22	23	24			
<b>Z-2</b>	<b>C-7</b>	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36			
<b>Z-3</b>	<b>QC-1</b>	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48			
<b>C-1</b>	<b>QC-2</b>	49	50	$E_i$	52	53	54	55	56	<b>QC-2</b>	58	59	60			
<b>C-2</b>	<b>QC-3</b>	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72			
<b>C-3</b>	$E_1$	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84			
<b>C-4</b>		85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	$E_n$	<b>QC-2</b>			

# L'analyse métabolomique du fluide folliculaire (FF) et du profil cytokinique chez des femmes atteintes d'endométriose

## 1. Recherche de biomarqueurs par analyse métabolomique ciblée du FF chez des femmes atteintes d'endométriose isolée

En cas d'endométriose, il est décrit un délai moyen de 7 ans entre l'apparition des 1ers symptômes et le diagnostic de la maladie (10). L'identification de biomarqueurs, notamment dans le sang ou les urines, offrirait une possibilité technique moins invasive que la chirurgie et faciliterait alors le diagnostic d'endométriose (30). Par ailleurs, l'effet de la pathologie sur l'altération de la compétence ovocytaire est aujourd'hui encore débattu (31).

Peu d'études se sont intéressées au profil métabolomique ou lipidomique du FF de femmes atteintes d'endométriose et les rares études sur le sujet ont inclus très peu de patientes (32-35).

Le but de notre étude était de comparer, chez des patientes prises en charge en FIV, le profil métabolomique du FF entre un groupe de femmes atteintes d'endométriose isolée et un groupe de femmes non atteintes afin d'évaluer s'il existait un impact de l'endométriose sur le micro-environnement cumulo-ovocytaire et potentiellement délétère sur la qualité ovocytaire.

### Principaux résultats

Soixante-dix-neuf patientes ont été incluses dans notre étude (39 dans le groupe endométriose et 40 dans le groupe contrôle). Dans le groupe endométriose, 32/39 patientes avaient une endométriose sévère avec atteinte ovarienne (82%). Les caractéristiques des patientes (âge, indice de masse corporelle, tabac, profil hormonal, compte de follicules antraux) étaient comparables entre le groupe endométriose et le groupe contrôle.

Nous n'avons pas retrouvé de différence significative entre le taux de maturité ovocytaire en ICSI en cas d'endométriose (72.2%) comparé à celui constaté dans le groupe contrôle (77.7%) ( $p=0.6$ ). Les taux de

fécondation en FIV ou ICSI était similaire dans le groupe endométriose et le groupe contrôle (respectivement 49.4% vs 50.2%,  $p=0.9$  et 76.4% vs 68.8%,  $p=0.5$ ).

Parmi les 188 métabolites analysés, 141 ont été correctement mesurés avec précision, incluant des hexoses, la carnitine et les acyl-carnitines à chaînes courtes, 21 acides aminés, 16 amines biogéniques, la sérotonine, l'histamine, la putrescine, la spermine, la spermidine, la taurine, 16 lysophosphatidylcholines, 70 phosphatidylcholines et 15 sphingomyélines. Au total nous disposons de 11139 mesures de concentrations ( $\mu\text{mol/L}$ ) correspondant à ces 141 métabolites analysés dans le FF de 79 patientes.

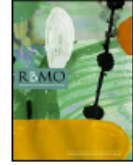
Après application de la correction de Benjamini-Hochberg, il n'était pas retrouvé de différence significative des concentrations moyennes des métabolites mesurés entre le groupe endométriose et le groupe contrôle. L'APC ne montrait aucun regroupement spontané d'échantillons en rapport avec la présence d'une endométriose ou de n'importe quelle autre caractéristique. Aucun modèle OPLS-DA n'a pu être obtenu pour discriminer les deux groupes.

## Conclusion

La contribution d'une altération du micro-environnement entourant le complexe cumulo-ovocytaire en cas d'infertilité lié à une endométriose reste débattu. En l'absence de signature métabolomique retrouvée dans le FF de femmes atteintes d'endométriose, nos résultats suggèrent qu'il n'existerait pas d'anomalies de l'environnement du complexe cumulo-ovocytaire pouvant être responsable d'une altération de la qualité ovocytaire en cas d'endométriose isolée.

Ces résultats ont fait l'objet d'un article accepté dans *Reproductive BioMedicine Online* (IF = 2.9) qui sera publié en décembre 2019.





## ARTICLE

# Metabolomics shows no impairment of the microenvironment of the cumulus–oocyte complex in women with isolated endometriosis



## BIOGRAPHY

Dr Pierre-Emmanuel Bouet is an obstetrics and gynaecology specialist, completing his training in reproductive endocrinology and infertility at Montreal University Hospital and Ovo Clinic in 2015. He is Head of the Reproductive Medicine Unit at Angers University Hospital and is also a member of the INSERM U1083 research team.

Pierre-Emmanuel Bouet<sup>1,3,\*</sup>, Juan Manuel Chao de la Barca<sup>2,3</sup>, Hady El Hachem<sup>4</sup>, Philippe Descamps<sup>1</sup>, Guillaume Legendre<sup>1</sup>, Pascal Reynier<sup>2,3</sup>, Pascale May-Panloup<sup>1,3,5</sup>

## KEY MESSAGE

Metabolomics shows no impairment of the microenvironment of the cumulus–oocyte complex in the follicular fluid of women with isolated endometriosis.

## ABSTRACT

**Research question:** Is there any metabolomic evidence of impairment of the cumulus–oocyte complex (COC) microenvironment in the follicular fluid of women with endometriosis?

**Design:** A prospective observational study from January to July 2018 at the Angers University Hospital, France. Seventy-nine women undergoing IVF with or without intracytoplasmic sperm injection (ICSI) were included: 39 for endometriosis-related infertility and 40 controls with other causes of infertility. A targeted quantitative metabolomic and lipidomic analysis was performed.

**Results:** Patient characteristics (age, body mass index, smoking status, hormonal profile and ovarian reserve markers) were comparable between the endometriosis and the control groups. There was no significant difference in the cumulative FSH dose used for stimulation between the endometriosis and the control groups (2732 versus 2257 IU, respectively). There were no differences in the oocyte maturity rates (72.2% versus 77.7%), or in the fertilization rates in IVF and ICSI (49.4% versus 50.2% and 76.4% versus 68.8%, respectively) between the endometriosis and control groups. Among the 188 metabolites analysed, 150 were accurately measured. Univariate analysis did not reveal any significant modification of metabolite concentrations, and none of the multivariate models discriminated between the two groups of patients, even when the study was restricted to the most severe form of endometriosis.

**Conclusions:** No specific metabolomic signature of endometriosis was found in the follicular fluid of women undergoing IVF. These results suggest that there is no microenvironmental impairment of the COC in cases of isolated endometriosis among women with infertility.

<sup>1</sup> Department of Reproductive Medicine, Angers University Hospital, Angers 49000, France

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Genetics, Angers University Hospital, Angers 49000, France

<sup>3</sup> MITOVASC Institute, CNRS 6015, INSERM U1083, Angers University, Angers 49000, France

<sup>4</sup> Department of Reproductive Medicine, Clemenceau Medical Centre Beirut, Lebanon

<sup>5</sup> Reproductive Biology Unit, Angers University Hospital, Angers 49000, France

© 2019 Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

\*Corresponding author. E-mail address: pierreemmanuel.bouet@chu-angers.fr (P.-E. Bouet). <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.08.001> 1472-6483/© 2019 Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Declaration: The authors report no financial or commercial conflicts of interest.

## KEYWORDS

Endometriosis  
Follicular fluid  
IVF  
Lipidomics  
Metabolomics  
Oocyte



## INTRODUCTION

**E**ndometriosis is a common gynaecological pathology affecting 5–10% of women of childbearing age (Bulun *et al.*, 2009), and it affects about 25% of women seeking infertility treatment (Schenken *et al.*, 1997; Wellberg, 1999). Endometriosis is difficult to diagnose because the symptoms, such as dysmenorrhoea and dyspareunia, are not specific. The current gold standard for confirming the diagnosis is laparoscopy (Poncelet and Ducarme, 2007), and on average, it is formally established after a 7-year delay (Nnoaham *et al.*, 2011). The identification of biomarkers, especially in the blood or urine, would offer a less invasive technique than surgery and greatly facilitate the diagnosis of endometriosis (May *et al.*, 2010). The mechanisms by which endometriosis causes infertility are probably numerous but are not yet clearly established (Bulun *et al.*, 2009). Endometriosis could have a negative impact on folliculogenesis, ovulation, oocyte quality, tubal mobility and implantation, and could involve mechanical, molecular, genetic and environmental factors (Macer *et al.*, 2012). Data from the current available literature are insufficient to conclude whether there is a link between endometriosis and oocyte quality impairment (Sanchez *et al.*, 2017), with contradictory results coming from four different meta-analyses (Barnhart *et al.*, 2002; Harb *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2015). Moreover, studies confirming the negative impact of endometriosis on oocyte quality have several confounding factors that could affect the results, such as the stage of endometriosis, previous disease-related medical/surgical treatments, and the possible concurrence of endometriosis and ovarian insufficiency, two of the most common causes of infertility.

Follicular fluid is produced by the transfer of blood plasma components across the blood follicular barrier, secretions of the theca and the granulosa cells, and molecules excreted by the oocytes (de la Barca *et al.*, 2017). The composition of the follicular fluid reflects the exchanges occurring between the oocyte and its microenvironment during the acquisition of gametic competence (Revelli *et al.*, 2009). Qualitative and quantitative alterations in the composition of the follicular fluid may be related to oocyte

quality and thus to embryonic quality (Da Broi *et al.*, 2018). Moreover, studies of the follicular fluid have allowed the identification of several biomarkers and altered metabolic pathways in several ovarian disorders such as diminished ovarian reserve (DOR) (de la Barca *et al.*, 2017; Fujii *et al.*, 2010) and polycystic ovarian syndrome (PCOS) (Cordeiro *et al.*, 2015).

Endometriosis patients have been found to have significantly higher levels of interleukin-8, interleukin-12 and adrenomedullin, an angiogenic mediator, as well as decreased fertilization rates and potentially decreased oocyte quality when compared with controls (Singh *et al.*, 2016). Lo Turco *et al.* (2013) used proteomic analysis of follicular fluid to show significant differences between women with endometriosis and women without, and between women with endometriosis who successfully conceived and those who did not. The proteins involved were apolipoprotein A-IV, transthyretin, complement factor I, vitronectin, kininogen 1 and focal adhesion kinase 1 (Lo Turco *et al.*, 2013). Only a few studies have focused on the metabolomic or lipidomic profiles in the follicular fluid of patients with endometriosis, and most of these studies were limited by the low number of participants (Cordeiro *et al.*, 2015; Karaer *et al.*, 2019; Marianna *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2018). The aim of the current study was to compare the metabolomic profiles of the follicular fluid in patients undergoing IVF for infertility secondary to endometriosis to those of patients without endometriosis, in order to analyse the potential impact of the disease on the oocyte microenvironment.

## MATERIALS AND METHODS

This was a prospective observational study performed at the Angers University Hospital, France, from January to July 2018.

### Study population

The follicular fluid retrieved from 79 women undergoing IVF was analysed, including 39 patients with endometriosis (endometriosis group) and 40 patients free from endometriosis (control group). The endometriosis group included women with minimal, mild or severe forms of endometriosis and for whom the diagnosis of endometriosis had been made either with ultrasound echography

or magnetic resonance imaging or after abdominal or pelvic surgery. Of these 39 patients, 32 had severe endometriosis, defined as stage III or stage IV endometriosis, according to the classification of the American Society of Reproductive Medicine (Schenken *et al.*, 1997). All seven patients with stage I and II disease had a history of abdominopelvic surgery that identified the peritoneal lesions and confirmed the diagnosis.

The control group included non-endometriosis women, under infertility management for unexplained infertility, male infertility or a tubal factor.

All the women included were treated with IVF or with intracytoplasmic sperm injection (ICSI), depending on the type of infertility. The indications for IVF included unexplained infertility and tubal factor and for ICSI antecedents of failed fertilization or suboptimal fertilization during an earlier IVF attempt, i.e. a fertilization rate below 20%, and male infertility with severe sperm abnormalities.

Exclusion criteria for both groups were PCOS, a history of cancer, and premature ovarian failure.

In the study centre, the first line protocol for endometriosis is the long protocol, based on several studies showing a better pregnancy rate with this type of protocol (Kolanska *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2008). All patients had ovarian stimulation with either a long protocol or an antagonistic protocol, using either recombinant or urinary gonadotrophins. When at least three follicles reached a size of 17 mm at ultrasound monitoring, ovulation was triggered with a total of 250 µg of recombinant human chorionic gonadotrophin (HCG) (Ovitrelle® Ovitrelle, Merck, Lyon, France). Ultrasound-guided, transvaginal oocyte retrieval was performed 36 h after the administration of HCG. Follicular fluid was collected from all aspirated follicles. Patients were enrolled on the morning of oocyte retrieval.

The rate of oocyte maturity was defined as the ratio between the number of oocytes injected and the number of oocytes recovered. Fertilization rates in IVF or IVF/ICSI procedures were defined as the ratio of the number of fertilized oocytes, with two pronuclei observed at 18 h post-fertilization, to the number of oocytes inseminated or injected.

### Samples

Once the oocytes were isolated for fertilization and culture, follicular fluid samples were collected in the study laboratory, pooled and immediately centrifuged for 10 min at 3000g at +4°C before recovery of the supernatant, which was conserved at -80°C in 500 µl aliquots until the metabolomic analysis.

Targeted quantitative metabolomic analysis was carried out using the Absolute/DQ® p180 Kit (Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Austria). This kit uses mass spectrometry (QTRAP 5500, SCIEX, Villebon-sur-Yvette, France) to quantify up to 188 different endogenous molecules distributed as follows: free carnitine (C0), 39 acylcarnitines (C), the sum of hexoses (H1), 21 amino acids, 21 biogenic amines and 105 lipids. Lipids are distributed in the kit in four different classes: 14 lysophosphatidylcholines (lysoPC), 38 diacyl phosphatidylcholines (PCaa), 38 acyl-alkyl-phosphatidylcholines (PCae) and 15 sphingomyelins (SM). Flow-injection analysis coupled with tandem mass spectrometry (FIA-MS/MS) was used for the analysis of carnitine, acylcarnitines, lipids and hexoses. Liquid chromatography was used for separating amino acids and biogenic amines before quantitation with mass spectrometry (MS).

Each follicular fluid sample was thoroughly vortexed after thawing and centrifuged at 4°C for 5 min at 5000g. Ten microliters of each sample were then added to the filter on the upper wells of the 96-well plate. Metabolites were extracted and derivatized for the quantitation of amino acids and biogenic amines. The extracts were finally diluted with MS running solvent before FIA and LC-MS/MS analysis. Three quality controls composed of human plasma samples at three concentration levels: low (QC1), medium (QC2) and high (QC3), were used to evaluate the performance of the analytical assay. A seven-point serial dilution of calibrators was added to the kit's 96-well plate to generate calibration curves for the quantification of amino acids and biogenic amines.

The primary endpoint of the study was to analyse and compare the mean concentrations of several metabolites to try and identify specific metabolic biomarkers of endometriosis.

### Statistical analysis

The raw data were examined before statistical analysis in order to exclude

metabolites with concentration values that are more than 20% below the lower limit of quantitation or above the upper limit of quantitation. Multivariate analysis was performed using principal component analysis (PCA) for the detection of sample grouping and outliers. Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) was then applied to maximize the variation between the endometriosis and control groups, and to determine the metabolites contributing to this variation. The quality of the OPLS-DA model was validated by two parameters, i.e. goodness of fit ( $R^2$ ), and goodness of prediction indicated by the cumulated  $Q^2$  value ( $Q^2_{cum}$ ). A threshold of 0.5 for  $Q^2_{cum}$  was used to determine whether an OPLS-DA model could be considered to have a good ( $Q^2_{cum} \geq 0.5$ ) or a poor ( $Q^2_{cum} < 0.5$ ) predictive capability. Multivariate data analysis was conducted using SIMCA-P v.14.0 (Umetrics, Umeå, Sweden).

Univariate analysis was performed with the bilateral Student's *t*-test. The Benjamini-Hochberg correction was applied in order to keep the risk of type I error below 5%. Differences were considered statistically significant for *P*-values <0.05.

### Ethical approval

The collection of follicular fluid samples was approved on 26 September 2017 by the Ethics Committee of the University Hospital of Angers, France (number DC-2014-2224 and AC-2016-2799), and all 79 participants gave their written informed consent.

## RESULTS

### Baseline characteristics of patients and cycles

Patient characteristics (age, body mass index [BMI], tobacco use, hormonal profile, ovarian reserve markers [FSH, anti-Müllerian hormone (AMH) and antral follicle count (AFC)]) are listed in TABLE 1. They were comparable between the endometriosis and control groups. Out of 39 patients in the endometriosis group, 32 (82%) had severe endometriosis, all of them with endometrioma. On the other hand, seven patients (18%) in the endometriosis group had only peritoneal disease that was diagnosed by laparoscopy, without endometriomas, and were therefore classified as stage I-II. Characteristics were also comparable between patients with stage I-II and

patients with severe endometriosis (data not shown).

The cycle characteristics are also described in TABLE 1. There were no differences in the oocyte maturity rates (72.2% versus 77.7%,  $P = 0.6$ ), or in the fertilization rates in IVF and ICSI (49.4% versus 50.2%,  $P = 0.9$  and 76.4% versus 68.8%,  $P = 0.53$ , respectively) between the endometriosis and control groups.

A sub-analysis was performed comparing the 32 patients with severe endometriosis to the control group (TABLE 1). Patient characteristics (age, BMI, tobacco usage, hormonal profile and ovarian reserve markers) were also comparable between these two groups. No significant difference was found in the oocyte maturity rate (72.6% versus 77.7%,  $P = 0.64$ ) or in the fertilization rates in IVF and ICSI (50.0% versus 50.2%,  $P = 0.98$ , and 75.4% versus 68.8%,  $P = 0.59$ , respectively) between the severe endometriosis group and the control group.

### Metabolomic analysis

Among the 188 metabolites analysed, 150 were accurately measured, including hexoses, carnitine and four short chain acyl-carnitines, 21 amino acids, 16 biogenic amines and serotonin, histamine, putrescine, spermine, spermidine and taurine, 16 lysophosphatidylcholines, 70 phosphatidylcholines and 15 sphingomyelins. The follicular fluid concentrations (µmol/l) of the 11,139 measured metabolites in the 79 individuals are given in Supplementary Table 1.

After application of the Benjamini-Hochberg correction, no significant differences in mean metabolite concentrations were found between the endometriosis and the control groups. PCA showed no grouping of data according to the presence of endometriosis or any other characteristic (FIGURE 1: parameters included in PC-1 and PC-2). PCA was performed for all endometriosis patients and controls (FIGURE 1A), as well as for the subgroup of patients with severe endometriosis and controls (FIGURE 1B).

In order to analyse whether the FSH dose received had any impact on the metabolomic signature in patients with endometriosis, they were divided into



**TABLE 1** BASELINE CHARACTERISTICS OF PATIENTS AND CYCLES IN ENDOMETRIOSIS GROUP, IN THE SUBGROUP OF PATIENTS WITH SEVERE ENDOMETRIOSIS AND IN THE CONTROL GROUP

	Endometriosis group (n = 39)	Severe endometriosis group (n = 32)	Control group (n = 40)
Age (years)	32.3 ± 4.1	32.4 ± 3.9	31.6 ± 4.4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.5 ± 4.2	23.1 ± 4.1	24.1 ± 3.9
Smoking status			
Non-smoker	24 (61.5)	19 (59.3)	24 (60)
Smoker	3 (7.7)	7 (21.9)	5 (12.5)
Former smoker	8 (20.5)	3 (9.4)	10 (25)
Information missing	4 (10.3)	3 (9.4)	1 (2.5)
Baseline oestradiol (pg/ml)	51.7 ± 45.0	50.4 ± 47.9	37.6 ± 16.1
Baseline FSH (IU/l)	7.6 ± 3.2	7.6 ± 3.4	8.5 ± 2.4
Baseline LH (IU/l)	4.7 ± 1.9	4.5 ± 1.6	5.5 ± 2.2
Baseline AMH (ng/ml)	2.6 ± 1.7	2.8 ± 1.9	3.1 ± 1.9
AFC	17.3 ± 7.9	17.6 ± 7.8	17.9 ± 6.8
Total dose of FSH per cycle (IU)	2732 ± 1250	2787 ± 1136	2257 ± 705
Type of protocol <sup>a</sup>			
Antagonist	21 (54.8)	16 (50.0)	39 (97.5)
Agonist	18 (46.2)	16 (50.0)	1 (2.5)
Stimulation			
FSH	26 (66.7)	22 (68.7)	33 (82.5)
FSH + LH	13 (33.3)	10 (31.3)	7 (17.5)
Treatment type			
IVF	19 (48.7)	13 (40.6)	16 (40.0)
ICSI	20 (51.3)	19 (59.4)	24 (60.0)
Oocytes per retrieval <sup>b</sup>	8.6 ± 6.8	8.3 ± 7.3	13.3 ± 5.8
Rate of oocyte maturity in ICSI (%) <sup>b</sup>	72.2	72.6	77.7
Fertilization rate in IVF (%) <sup>c</sup>	49.4	50.0	50.2
Fertilization rate in ICSI (%) <sup>d</sup>	76.4	75.4	68.8
Ongoing pregnancy rate (%) <sup>e</sup>	13.0	15.6	20.0

Data are expressed as n (%), percentage or mean ± SD.

AFC = antral follicle count; AMH = anti-Müllerian hormone; BMI = body mass index; ICSI = intracytoplasmic sperm injection.

<sup>a</sup> Statistically significant differences ( $P < 0.001$ ) between endometriosis group and control group and between severe endometriosis group and control group. All other  $P$ -values are non-significant.

<sup>b</sup> Number of mature oocytes injected / number of oocytes recovered.

<sup>c</sup> Number of embryos obtained at stage 2 pronuclei / number of inseminated oocytes.

<sup>d</sup> Number of embryos obtained at stage 2 pronuclei / number of oocytes injected.

<sup>e</sup> Ongoing pregnancy rate was defined when the pregnancy had completed >20 weeks of gestation.

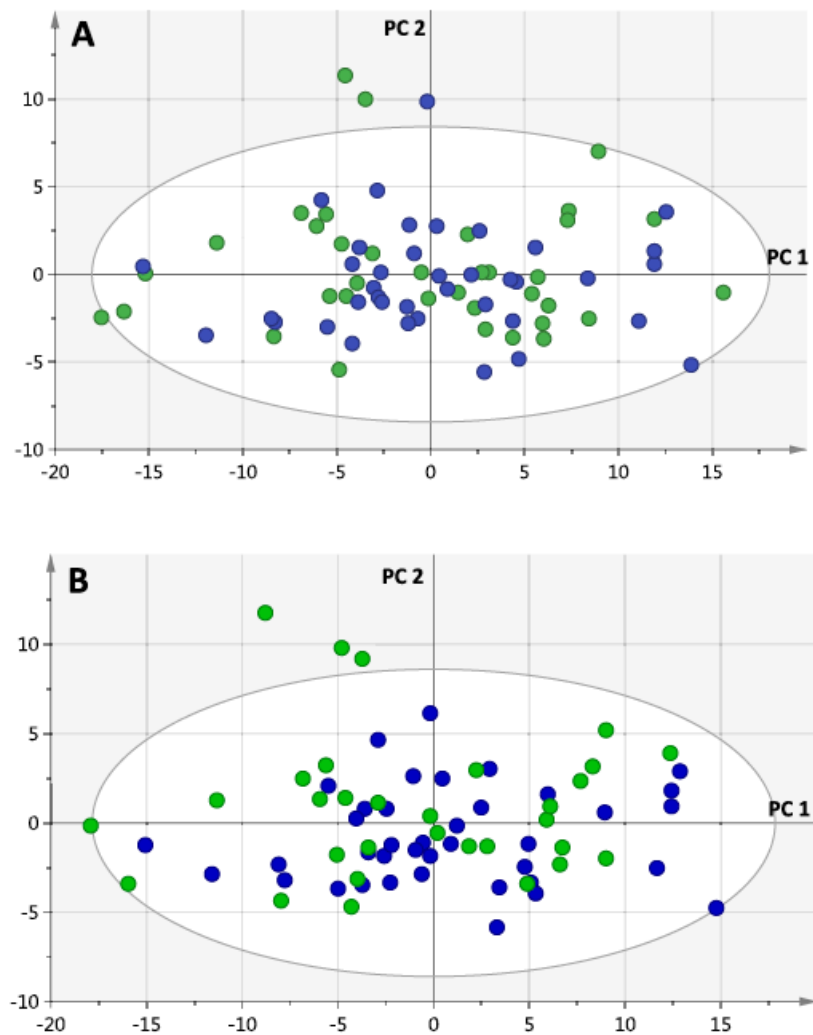
two groups: those receiving a total dose of FSH per cycle  $\geq 3000$  IU ( $n = 15$ ) and those receiving  $< 3000$  IU ( $n = 24$ ). No predictive multivariate OPLS-DA was found to separate these two groups. Furthermore, when the FSH dose was set as the predictive dependent variable, no predictive multivariate (OPLS) model was found.

Finally, in order to assess the impact of age, patients in both groups were divided into three subgroups:  $\leq 30$  years old, between 30 and 34 years old, and  $\geq 35$  years old, and OPLS-DA models were constructed for each subgroup in order to take age into account as a possible confounding factor. However, no

predictive OPLS-DA models were found to separate controls from patients with endometriosis in any age subgroups.

Multivariate supervised modelling failed to find a predictive OPLS-DA model discriminating between the endometriosis and control groups with an even negative value for cumulated  $Q^2_{cum}$  (FIGURE 2A), and between patients with severe endometriosis ( $n = 32$ ) and the control group (FIGURE 2B). Negative  $Q^2_{cum}$  values indicate very poor predictive capabilities, even when relatively well-separated groups appear in the scatter plot. This separation is due to overoptimistic models that find directions or latent

variables where compared groups seem well discriminated. However, these latent variables do not contain systematic variations of the original predictive variables (i.e. metabolites) determining group discrimination, but (random) noise instead. Therefore, when a sample set, not used for model construction but instead coming from the same population in which the model has been built, is submitted to this model, its predictive capabilities (i.e. right class allocation) are very poor and not very different from the prediction of a random model (i.e. flipping a coin to predict whether a patient belongs to the endometriosis or to the control group).



**FIGURE 1** First principal plan scatter plot of the PCA built with 141 metabolites accurately measured in follicular fluid of endometriosis and control patients (A) or severe endometriosis and control patients (B). No grouping of data can be distinguished. Even when some points appear out of the confidence ellipse, they are not stronger outliers when considering not only the first two but all the principal components. Green circles represent endometriosis patients and blue circles control patients (PCA = principal component analysis; PC 1, 2 = first and second principal component).

## DISCUSSION

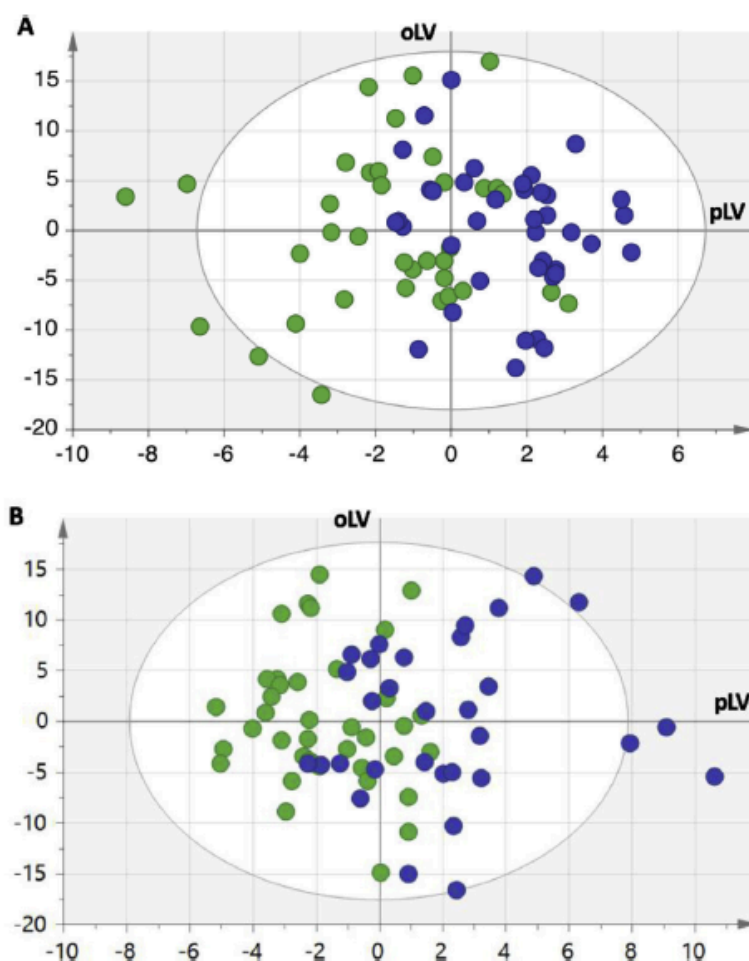
The current study aimed to analyse the impact of endometriosis on female fertility based on metabolomic analysis of the follicular fluid in patients undergoing IVF/ICSI. An attempt was made to find specific biomarkers of the disease that would improve understanding of the pathophysiologic mechanisms by which endometriosis negatively affects the oocyte microenvironment and fertility.

Several metabolomic signatures related to endometriosis have been recently identified in biological fluids. Indeed, altered levels of amino acids, purines

and phospholipids were found in the endometrium (*Li et al., 2018a, 2018b*), while altered levels of carnitine, acylcarnitines, phosphatidylcholines and sphingomyelins were found in the peritoneal fluid (*Vouk et al., 2016*), and altered levels of acylcarnitines were found in the plasma (*Letsiou et al., 2017*). Except for the purine metabolites, all these metabolites were analysed by the study centre's analytical pipeline.

On the other hand, several metabolomic studies have identified metabolomic or lipidomic signatures in the follicular fluid of patients with endometriosis. *Cordeiro et al. (2015)* compared the

follicular fluid lipidome of 10 patients with endometriosis to 10 controls, and found increased concentrations of sphingolipids and phosphatidylcholines in the endometriosis group. *Marianna et al. (2017)* compared the metabolome of the follicular fluid of 16 patients with endometriosis stage I–II ( $n = 8$ ) or stage III–IV ( $n = 8$ ) to 7 controls, and found significantly higher concentrations of phospholipids and lactates in the endometriosis group, and significantly lower concentrations of fatty acids, lysine, choline, glucose, aspartate, alanine, leucine, valine, proline and phosphocholine. A recent metabolomic study that used nuclear



**FIGURE 2** OPLS-DA scatter plot for models comparing all endometriosis patients (A) or only patients with severe endometriosis (B) to the control group, using 141 accurately measured metabolites as predictive variables and endometriosis status as explained variable. When points are projected to the predictive latent variable (pLV), no group separation is achieved in either case by the OPLS-DA models. This graphical representation is in total agreement with the poor predictive qualities of the supervised models. Green circles represent endometriosis patients and blue circles control patients (OPLS-DA = orthogonal partial least squares discriminant analysis; oLV = orthogonal latent variable; pLV = predictive latent variable).

magnetic resonance spectroscopy in 12 endometriotic patients and 12 controls found elevated lactate, glucose, pyruvate and valine levels in cases of endometriosis (Karaer et al., 2019).

The current study assessed these same metabolites, but did not find any discriminant signature in the follicular fluid of patients with endometriosis, regardless of the stage of the disease, despite using the same rigorously standardized targeted metabolomic methods used in a previous study in patients with DOR, and which showed significant differences (de la Barca et al., 2017). Thus, no attempt was made to identify any significantly modified metabolites with univariate analysis coupled with the Bonferroni-Hochberg correction (a necessary correction in the context of multiple comparisons to

avoid type I errors). Furthermore, this study did not find any OPLS-DA model discriminating between the endometriosis and the control group, even when the study was restricted to the most severe forms of endometriosis (stages III-IV).

Several factors could explain the discordance between the findings of this study and the published literature, i.e. the lack of a specific metabolomics signature in the follicular fluid of patients with endometriosis. First of all, most of the published studies included relatively small numbers of patients, around 10-15 in the endometriosis and control groups, whereas this study included 39 patients and 40 controls, thus improving its statistical power. On the other hand, most of these studies included women with a high risk of DOR: Marianna et al. (2017)

included women with an average age of 35 years and with low serum AMH levels (<2 ng/ml), whereas Karaer et al., (2019) included women up to 40 years of age. It has previously been shown that women with DOR had a significantly different metabolomics signature in the follicular fluid when compared with controls with a normal ovarian reserve (de la Barca et al., 2017). Therefore, the DOR could have influenced the differences found that were attributed to endometriosis in the aforementioned studies.

The number of oocytes retrieved was significantly lower in the endometriosis group compared with the control group, but the rate of oocyte maturity and fertilization rate were comparable between the two groups. Several studies have already reported a lower number



of oocytes retrieved in endometriosis patients (Sanchez *et al.*, 2017). This could be due to the difficulties sometimes encountered during retrieval in cases of severe endometriosis (Benaglia *et al.*, 2018). Indeed, access to the follicles may be difficult because of the presence of a large endometrioma, or because of the position of the ovary (retro-uterine or high in the pelvic cavity). Moreover, there is the risk of an infectious complication should the puncture needle pass through an endometrioma or a dilated tube (Benaglia *et al.*, 2018).

To date, there is no consensus on the direct impact of endometriosis on the capacity of the oocyte to fertilize and sustain early embryo development. A recent literature review (Sanchez *et al.*, 2017) analysed the conflicting results of all published meta-analyses that evaluated the fertilization rate for patients with endometriosis (Barnhart *et al.*, 2002; Harb *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2015). The oldest study, dating back to 2002, compared the fertilization rate for patients with isolated endometriosis, i.e. with the absence of any other infertility factors, to that of a control group of patients with tubal factor infertility (Barnhart *et al.*, 2002). The authors found a significantly lower fertilization rate in the isolated endometriosis group compared with the control group (59.5% versus 66.1%,  $P < 0.001$ ) (Barnhart *et al.*, 2002). More recently, two other meta-analyses found no significant decrease in the fertilization rate or the embryo quality, even in patients with severe endometriosis or endometriomas (Harb *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015). In this study, the ovarian reserve markers (AFC, AMH, FSH) were comparable between the endometriosis and control groups, even in the presence of endometriomas. These findings are in accordance with studies showing that endometriosis and endometriomas do not necessarily diminish the ovarian reserve by themselves, but it is the surgery of these lesions that does the damage (Streuli *et al.*, 2012). Furthermore, no difference was found in the oocyte maturity and fertilization rates between the two groups. The relationship between oocyte quantity and quality is still the subject of debate: while some studies report a decrease in oocyte quality that parallels the decrease in ovarian reserve (Gleicher *et al.*, 2009, 2011), others report that there is no direct correlation, with women with DOR having

equivalent embryo quality and live birth rates to matched controls with normal ovarian reserve (Morin *et al.*, 2018). The endometriosis patients in this study had normal ovarian reserve, thus a probably normal oocyte quality. The fact that no specific metabolomic signature was found in their follicular fluid could indicate that, in the absence of other confounding factors, endometriosis had no deleterious effect on the oocyte microenvironment.

One of the limitations of this study is the fact that ovarian stimulation with exogenous gonadotrophins could have altered follicular metabolomics. Indeed, an in-vitro model and an animal study have shown that ovarian stimulation with gonadotrophins could modify the metabolomic and the lipid profile, in the serum as well as the follicular fluid (Perovic *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2017).

Several ovarian pathologies have been shown to alter the microenvironment of the COC, but the impact of endometriosis in women with infertility remains the subject of debate. The current study did not find any specific metabolomic signature of endometriosis in the follicular fluid of women with infertility undergoing IVF/ICSI, thus confirming the lack of impairment of the COC microenvironment by endometriosis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Kanaya Malkani for critical reading and comments on the manuscript and to the women who participated in this study.

This work was supported by the University Hospital of Angers, the University of Angers, and the French national research centres, INSERM and CNRS.

## SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.rbmo.2019.08.001.

## REFERENCES

- Barnhart, K., Dunsmoor-Su, R., Coutifaris, C. **Effect of endometriosis on in vitro fertilization.** *Fertil. Steril.* 2002; 77: 1148–1155
- Benaglia, L., Busnelli, A., Biancardi, R., Vegetti, W., Reschini, M., Vercellini, P., Somigliana, E. **Oocyte retrieval difficulties in women with ovarian endometriomas.** *Reprod. Biomed. Online* 2018; 37: 77–84
- Bulun, S.E. **Endometriosis.** *N. Engl. J. Med.* 2009; 360: 268–279
- Cordeiro, F.B., Cataldi, T.R., Perkel, K.J., do Vale Teixeira da Costa, L., Rochetti, R.C., Stevanato, J., Eberlin, M.N., Zylbersztein, D.S., Cedenho, A.P., Lo Turco, E.G. **Lipidomics analysis of follicular fluid by ESI-MS reveals potential biomarkers for ovarian endometriosis.** *J. Assist. Reprod. Genet.* 2015; 32: 1817–1825
- Cordeiro, F.B., Cataldi, T.R., do Vale Teixeira da Costa, L., de Lima, C.B., Stevanato, J., Zylbersztein, D.S., Ferreira, C.R., Eberlin, M.N., Cedenho, A.P., Lo Turco, E.G. **Follicular fluid fingerprinting from women with PCOS and hyper response during IVF treatment.** *J. Assist. Reprod. Genet.* 2015; 32: 45–54
- Da Broi, M.G., Giorgi, V.S.I., Wang, F., Keefe, D.L., Albertini, D., Navarro, P.A. **Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications.** *J. Assist. Reprod. Genet.* 2018; 35: 735–751
- de la Barca, J.M.C., Boueilh, T., Simard, G., Boucret, L., Ferré-L'Hotellier, V., Tessier, L., Gadras, C., Bouet, P.E., Descamps, P., Procaccio, V., Reynier, P., May-Panloup, P. **Targeted metabolomics reveals reduced levels of polyunsaturated choline plasmalogens and a smaller dimethylarginine/arginine ratio in the follicular fluid of patients with a diminished ovarian reserve.** *Hum. Reprod.* 2017; 32: 2269–2278
- Fujii, E.Y., Nakayama, M. **The measurements of RAGE, VEGF, and AGEs in the plasma and follicular fluid of reproductive women: the influence of aging.** *Fertil. Steril.* 2010; 94: 694–700
- Gleicher, N., Weghofer, A., Oktay, K., Barad, D. **Do etiologies of premature ovarian aging (POA) mimic those of premature ovarian failure (POF)?** *Hum. Reprod.* 2009; 24: 2395–2400
- Gleicher, N., Weghofer, A., Barad, D.H. **Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging.** *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2011; 9: 23
- Harb, H.M., Gallos, I.D., Chu, J., Harb, M., Coomarasamy, A. **The effect of endometriosis on in vitro fertilisation outcome: a systematic review and meta-analysis.** *BJOG* 2013; 120: 1308–1320
- Karaer, A., Tunçay, G., Mumcu, A., Dogan, B. **Metabolomics analysis of follicular fluid in women with ovarian endometriosis undergoing in vitro fertilization.** *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2019; 65: 39–47
- Kolanska, K., Cohen, J., Bendifallah, S., Selleret, L., Antoine, J.M., Chabbert-Buffet, N., Darai, E., d'Argent, E.M. **Pregnancy outcomes after controlled ovarian hyperstimulation in women with endometriosis-associated infertility: GnRH-agonist versus GnRH-antagonist.** *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* 2017; 46: 681–686
- Letsiou, S., Peterse, D.P., Fassbender, A., Hendriks, M.M., van den Broek, N.J., Berger, R., O, D.F., Vanhie, A., Vodolazkaia, A., Van

- Langendonck, A., Donnez, J., Harms, A.C., Vreeken, R.J., Groothuis, P.G., Dolmans, M.M., Brenkman, A.B., D'Hooghe, T.M. **Endometriosis is associated with aberrant metabolite profiles in plasma.** *Fertil. Steril.* 2017; 107: 699–706.e6
- Li, J., Gao, Y., Guan, L., Zhang, H., Sun, J., Gong, X., Li, D., Chen, P., Ma, Z., Liang, X., Huang, M., Bi, H. **Discovery of Phosphatidic Acid, Phosphatidylcholine, and Phosphatidylserine as Biomarkers for Early Diagnosis of Endometriosis.** *Front. Physiol.* 2018; 9: 14
- Li, J., Guan, L., Zhang, H., Gao, Y., Sun, J., Gong, X., Li, D., Chen, P., Liang, X., Huang, M., Bi, H. **Endometrium metabolomic profiling reveals potential biomarkers for diagnosis of endometriosis at minimal-mild stages.** *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2018; 16: 42
- Lo Turco, E.G., Cordeiro, F.B., Lopes, P.H., Gozzo, F.C., Pilau, E.J., Soler, T.B., da Silva, B.F., Del Giudice, P.T., Bertolla, R.P., Fraietta, R., Cedenho, A.P. **Proteomic analysis of follicular fluid from women with and without endometriosis: new therapeutic targets and biomarkers.** *Mol. Reprod. Dev.* 2013; 80: 441–450
- Ma, C., Qiao, J., Liu, P., Chen, G. **Ovarian suppression treatment prior to in-vitro fertilization and embryo transfer in Chinese women with stage III or IV endometriosis.** *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2008; 100: 167–170
- Macer, M.L., Taylor, H.S. **Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility.** *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 2012; 39: 535–549
- Marianna, S., Alessia, P., Susan, C., Francesca, C., Angela, S., Francesca, C., Antonella, N., Patrizia, I., Nicola, C., Emilio, C. **Metabolomic profiling and biochemical evaluation of the follicular fluid of endometriosis patients.** *Mol. Biosyst.* 2017; 13: 1213–1222
- May, K.E., Conduit-Hulbert, S.A., Villar, J., Kirtley, S., Kennedy, S.H., Becker, C.M. **Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review.** *Hum. Reprod. Update* 2010; 16: 651–674
- Morin, S.J., Patounakis, G., Juneau, C.R., Neal, S.A., Scott, R.T.Jr, Seli, E. **Diminished ovarian reserve and poor response to stimulation in patients < 38 years old: a quantitative but no qualitative reduction in performance.** *Hum. Reprod.* 2018; 33: 1489–1498
- Nnoaham, K.E., Hummelshoj, L., Webster, P., d'Hooghe, T., de Cicco Nardone, F., de Cicco Nardone, C., Jenkinson, C., Kennedy, S.H., Zondervan, K.T. **Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries.** *Fertil. Steril.* 2011; 96: 366–373.e8
- Perovic, M.D., Sudar-Milovanovic, E.M., Simonovic, E.D., Resanovic, I.M., Draganic, V.D., Radakovic, J.D., Soldatovic, I.A., Isenovic, E.R. **Hypothesis regarding the effects of gonatropins on the level of free fatty acids and phospholipids in serum and follicular fluid during controlled ovarian stimulation.** *Med. Hypotheses* 2019; 123: 30–34
- Poncelet, C., Ducarme, G. **Endometriosis: good practice rules for diagnostic laparoscopy.** *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.* 2007; 36: 135–140
- Revelli, A., Delle Piane, L., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., Rinaudo, P. **Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics.** *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2009; 7: 40
- Rossi, A.C., Prefumo, F. **The effects of surgery for endometriosis on pregnancy outcomes following in vitro fertilization and embryo transfer: a systematic review and meta-analysis.** *Arch. Gynecol. Obstet.* 2016; 294: 647–655
- Sanchez, A.M., Vanni, V.S., Bartiromo, L., Papaleo, E., Zilberberg, E., Candiani, M., Orvieto, R., Vigano, P. **Is the oocyte quality affected by endometriosis? A review of the literature.** *J. Ovarian. Res.* 2017; 10: 43
- Santos, P.H., Fontes, P.K., Franchi, F.F., Nogueira, M.F., Belaz, K.R., Tata, A., Eberlin, M.N., Sudano, M.J., Barros, C.M., Castilho, A.C. **Lipid profiles of follicular fluid from cows submitted to ovarian superstimulation.** *Theriogenology* 2017; 94: 64–70
- Schenken, R.S., Guzick, D.S. **Revised endometriosis classification: 1996.** *Fertil. Steril.* 1997; 67: 815–816
- Singh, A.K., Dutta, M., Chattopadhyay, R., Chakravarty, B., Chaudhury, K. **Intrafollicular interleukin-8, interleukin-12, and adrenomedullin are the promising prognostic markers of oocyte and embryo quality in women with endometriosis.** *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016; 33: 1363–1372
- Streuli, I., de Ziegler, D., Gayet, V., Santulli, P., Bijaoui, G., de Mouzon, J., Chapron, C. **In women with endometriosis anti-Mullerian hormone levels are decreased only in those with previous endometrioma surgery.** *Hum. Reprod.* 2012; 27: 3294–3303
- Sun, Z., Song, J., Zhang, X., Wang, A., Guo, Y., Yang, Y., Wang, X., Xu, K., Deng, J. **Novel SWATHTM technology for follicular fluid metabolomics in patients with endometriosis.** *Pharmazie* 2018; 73: 318–323
- Vouk, K., Ribič-Pucelj, M., Adamski, J., Rižner, T.L. **Altered levels of acylcarnitines, phosphatidylcholines, and sphingomyelins in peritoneal fluid from ovarian endometriosis patients.** *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2016; 159: 60–69
- Wellbery, C. **Diagnosis and treatment of endometriosis.** *Am. Fam. Physician* 1999; 60: 1753–1762
- Yang, C., Geng, Y., Li, Y., Chen, C., Gao, Y. **Impact of ovarian endometrioma on ovarian responsiveness and IVF: a systematic review and meta-analysis.** *Reprod. Biomed. Online* 2015; 31: 9–19

Received 11 April 2019; received in revised form 18 July 2019; accepted 6 August 2019.

## 2. Recherche de biomarqueurs par analyse des cytokines dans le FF de femmes atteintes d'endométriose sévère

Plusieurs facteurs, intervenant dans les processus inflammatoires chroniques et dans le contrôle de la réponse immunitaire, ont été impliqués dans la physiopathologie de l'endométriose (hormones, cytokines, chemokines et marqueurs du stress oxydant). En particulier, une modification du profil cytokinique a été mise en évidence dans le liquide péritonéal, le tissu endométrial, les endométriomes ou le sang des femmes atteintes (36,37). Concernant le FF, les études sont plus rares et hétérogènes (38-40).

Le but de notre étude était donc de comparer les profils cytokiniques du FF de patientes ayant eu une FIV dans le cadre d'une endométriose sévère isolée à ceux de patientes non atteintes d'endométriose. Nous avons aussi cherché à évaluer l'impact potentiel de l'endométriose sur le micro-environnement ovocytaire.

### Principaux résultats

Quatre-vingt-sept patientes ont été incluses dans notre étude (43 dans le groupe endométriose et 44 dans le groupe contrôle). Les caractéristiques de patientes (âge, IMC, tabac, profil hormonal, compte de follicules antraux) étaient comparables entre le groupe endométriose et le groupe contrôle. Concernant l'analyse des cytokines, GM-CSF et IL5 donnaient des valeurs inexploitable (zéro), notre analyse a donc porté sur 57 composés.

Après correction de Benjamini-Hochberg, la concentration de 9 cytokines (MCP-1, IL-6, IL-8, IL-1  $\beta$ , IL-5, chitinase 3-like 1, osteocalcine, MMP3 et FGF basis) était retrouvée comme significativement plus élevée dans le FF de patientes atteintes d'endométriose comparé à celles du groupe contrôle.

Après analyse multivariée et application du modèle LASSO, seul MCP1 avait un coefficient non nul.

En observant les valeurs de MCP1 dans notre population d'endométriose nous avons distingué 2 sous-groupes de patientes. Le premier sous-groupe présentait une concentration équivalente (groupe MCP1-) à celle des patientes normales alors que le deuxième sous-groupe présentait des valeurs beaucoup plus élevées (groupe MCP1+).



Après correction de Benjamini-Hochberg, la concentration de 11 cytokines (les mêmes que celles qui distinguaient nos deux premiers groupes, plus GCSF, sTNF\_R1 et BAFF et moins l'ostéocalcine) était retrouvée significativement plus élevée dans le FF du sous-groupe de patientes MCP1+ comparé au sous-groupe de patientes MCP1-.

L'analyse du profil inflammatoire de ces 2 sous-groupes, par rapport aux patientes contrôles, mettait en évidence une dérégulation de ce profil uniquement chez les femmes MCP1+.

De manière intéressante l'analyse des données cliniques montraient une différence significative entre ces 2 sous-groupes quant au nombre d'ovocytes recueillis et ( $6 \pm 3,6$  pour MCP1+ et  $11,3 \pm 8,3$  pour MCP1- ;  $p = 0,01$ ) et au taux d'estradiol basal chez la patiente ( $82,1 \pm 67,2$  pour MCP1+ et  $32,6 \pm 12,9$  pour MCP1- ;  $p = 0,002$ ). Les mêmes constatations étaient faites lorsque l'on comparait MCP1+ aux contrôles ( $p < 0,001$  pour ces 2 variables) alors qu'aucune différence n'était retrouvée entre MCP1- et les contrôles. Enfin, le nombre d'embryons « top-quality » était plus faible dans le groupe MCP1+ (49%) que dans le groupe MCP1- (65%) mais la différence n'était pas significative ( $p=0.1$ ).

## Conclusion

Notre étude permet de constater une hétérogénéité biologique de l'endométriose, avec une forme associée à une altération du microenvironnement ovocytaire surexprimant MCP1. Il conviendrait de reconsidérer l'intérêt de MCP1 en tant que biomarqueur dans le cadre de l'endométriose et notamment de réévaluer son dosage sanguin pour prédire la réponse ovarienne à la stimulation afin de prendre en compte cette hétérogénéité inattendue.

Ces résultats font l'objet d'un article actuellement soumis à *Human Reproduction* (IF = 5.5).

1           **Title page**

2           **Title**

3           Elevated levels of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in the follicular fluid reveals  
4           different populations among women with severe endometriosis.

5

6           **Running title**

7           Cytokinome exploration of follicular fluid and endometriosis.

8

9           **Authors**

10          P.E. Bouet<sup>1,2\*</sup>, J.M. Chao de la Barca<sup>2,3</sup>, L. Boucret<sup>1,6</sup>, P. Descamps<sup>1</sup>, G. Legendre<sup>1</sup>, H. El  
11          Hachem<sup>7</sup>, S. Blanchard<sup>4,5</sup>, P. Jeannin<sup>4,5</sup>, P. Reynier<sup>2,3</sup>, and P. May-Panloup<sup>1,2,6</sup>

12          <sup>1</sup>Department of Reproductive Medicine, Angers University Hospital, 49000 Angers, France.

13          <sup>2</sup>MITOVASC Institute, CNRS 6015, INSERM U1083, Angers University, 49000 Angers,  
14          France.

15          <sup>3</sup>Department of Biochemistry and Genetics, Angers University Hospital, 49000 Angers, France.

16          <sup>4</sup>CRCINA, INSERM, Nantes and Angers Universities, LabEx IGO, 49000 Angers, France.

17          <sup>5</sup>Department of Immunology and Allergology, Angers University Hospital, 49000 Angers,  
18          France.

19          <sup>6</sup>Reproductive Biology Unit, Angers University Hospital, 49000 Angers, France.

20          <sup>7</sup>Department of Reproductive Medicine, Clemenceau Medical Center, Beirut, Lebanon.

21

22          **Correspondence to:** Dr Pierre-Emmanuel Bouet, Department of Reproductive Medicine,

23          Angers University Hospital, 49000 Angers, France. [pebouet@hotmail.com](mailto:pebouet@hotmail.com)

**Abstract**

**Study question:** Is there a modification of the cytokine profile of the follicular fluid (FF) of women with endometriosis undergoing in vitro fertilization (IVF)?

**Summary answer:** We have found an important biologic heterogeneity in patients with endometriosis, with different levels of MCP-1 expression in the follicular fluid, and we have identified a specific subtype, with a high FF MCP-1 level, that is associated with a significant alteration of the oocyte microenvironment.

**What is known already:** Several factors implicated in the acute and chronic inflammatory reaction (hormones, cytokines, chemokines and markers of oxidative stress) are thought to be involved in the pathophysiology of endometriosis. Indeed, an alteration of the cytokine profile has been shown in the serum, the peritoneal fluid, the endometrial tissue, and in endometriomas of women with endometriosis. Different biological signatures have been assessed in order to better understand the pathophysiology behind the endometriosis-related infertility, using proteomics, metabolomics and the analysis of the cytokine profile. However, such studies have been scarce and have yielded disparate results.

**Study design, size, duration:** We performed a prospective observational study on the follicular fluid retrieved from 87 women undergoing IVF with or without intracytoplasmic sperm injection from January 2018 to February 2019 at the Angers University Hospital, France.

**Participants/materials, setting, methods:** The patients were divided into two groups: the endometriosis group and the control group. The endometriosis group comprised 43 patients with severe endometriosis. The control group included 44 patients undergoing IVF for other causes and without endometriosis. The cytokine profile of the FF was determined by multiplex fluorescent-bead-based technology allowing the measurement of 59 cytokines.

47 **Main results and the role of chance:** Univariate analysis showed a significant increase of nine  
48 cytokines in the FF in the endometriosis group compared to the control group, while Monocyte  
49 Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) was the only variable retained in the multivariate analysis.  
50 We identified two subgroups of patients in the endometriosis group: MCP-1- group (n=23)  
51 which had FF MCP-1 levels comparable to the control group and MCP-1+ (n=20) which had  
52 significantly higher FF levels. Only patients in the MCP-1+ group had a significantly altered  
53 cytokine profile in the FF, and had a significantly higher serum estradiol level (p=0.002) and a  
54 significantly lower number of oocytes recovered (p=0.01) compared to the MCP-1- and the  
55 control group.

56 **Limitations, reasons for caution:** One potential limitation of our study is the lack of  
57 assessment of serum MCP-1 levels, which could have been compared to those in the follicular  
58 fluid.

59 **Wider implications of the findings:** Our study has shown an alteration of the oocyte  
60 microenvironment in women with endometriosis associated with high follicular fluid levels of  
61 MCP-1 allowing the identification of a subgroup of endometriosis patients with a potentially  
62 worse prognosis.

63 **Study funding/competing interest(s):** This work was supported by the University Hospital of  
64 Angers, the University of Angers, and the French national research centers, INSERM and  
65 CNRS.

66 **Trial registration number:** NA.

67

## 68 **Keywords**

69 Follicular fluid, cytokines, endometriosis, oocyte, MCP-1.

## 70            **Introduction**

71            Endometriosis is a chronic disease affecting 10% of women of reproductive age (Bulun,  
72 2009). Women with endometriosis often present with dysmenorrhea and pelvic pain,  
73 dyspareunia, and in 25% of cases, infertility (Schenken *et al.*, 1997; Wellbery, 1999). The  
74 mechanisms by which endometriosis causes infertility are not yet clearly established, but  
75 several factors have been incriminated (Bulun, 2009). Endometriosis could have a negative  
76 impact on folliculogenesis, ovulation, oocyte quality, tubal mobility, and implantation, with  
77 several mechanical, immunological, genetic and environmental factors implicated (Macer *et*  
78 *al.*, 2012).

79            The direct impact of endometriosis on oocyte quality has been demonstrated in studies using  
80 the oocyte donation model. Hanzman *et al.* showed that implantation rates were significantly  
81 lower in recipients without evidence of endometriosis who received oocyte donation from  
82 women with endometriosis compared to recipients with endometriosis who received oocytes  
83 from women without endometriosis (Hanzman *et al.* 2013). However, four meta-analyses on  
84 the subject gave conflicting results (Barnhart *et al.*, 2002; Harb *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2016;  
85 Yang *et al.*, 2015), and data are still insufficient to confirm the direct link and the mechanisms  
86 behind it (Sanchez *et al.*, 2017). Indeed, various elements could affect these results, such as the  
87 stage of the disease, the previous medical or surgical treatment history, and the presence of  
88 other comorbidities that could impact fertility, independently of endometriosis.

89            Several factors implicated in the acute and chronic inflammatory reaction (hormones,  
90 cytokines, chemokines and markers of oxidative stress) are thought to be involved in the  
91 pathophysiology of endometriosis. Indeed, an alteration of the cytokine profile has been shown  
92 in the serum, the peritoneal fluid, the endometrial tissue, and in endometriomas of women with  
93 endometriosis (Coutinho *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019). Recent studies have focused on the

94 follicular fluid (FF) composition as a means of assessing the oocyte -and the resulting embryo's  
95 - quality (Da Broi *et al.*, 2018), since it reflects the exchanges occurring between the oocyte  
96 and its microenvironment during the acquisition of gametic competence along oogenesis and  
97 folliculogenesis (Revelli *et al.*, 2009). Different biological signatures have been assessed in  
98 order to better understand the pathophysiology behind the endometriosis-related infertility,  
99 using proteomics (Lo Turco *et al.*, 2013), metabolomics (Bouet *et al.*, 2019; Cordeiro *et al.*,  
100 2015; Karaer *et al.*, 2018; Marianna *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2018) and the analysis of the  
101 cytokine profile (Hammadeh *et al.*, 2002; Malhotra *et al.*, 2012; Pellicer *et al.*, 1998; Singh *et*  
102 *al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017). However, such studies have been scarce and have yielded disparate  
103 results.

104 Therefore, the aim of our study was to compare the cytokine profiles of the FF in patients  
105 undergoing *in vitro* fertilization (IVF) for isolated forms of severe endometriosis to those of  
106 patients free from endometriosis, and to evaluate the potential impact of the disease on the  
107 oocyte microenvironment.

108

109

110

111

112

113

114

115



## 116 **Materials and Methods**

### 117 **Patients**

118 We performed a prospective observational study at Angers University Hospital, France,  
119 between January 2018 and February 2019. The study was approved by the Ethics Committee  
120 of the University Hospital of Angers, France (Number DC-2014-2224 and AC-2016-2799), and  
121 all participants gave their informed consent before inclusion.

122 We included only patients with severe endometriosis according to the classification of the  
123 American Society of Reproductive Medicine (Schenken *et al.*, 1997), i.e. having an  
124 endometrioma and classified as stage III or stage IV. The diagnosis of endometriosis had been  
125 previously confirmed by ultrasound or Magnetic Resonance Imaging (MRI), or following  
126 abdomino-pelvic surgery. Women without endometriosis, undergoing IVF for other indications  
127 (unexplained, male factor, tubal factor.), were included as the control group. Patients in both  
128 groups had either IVF or intracytoplasmic sperm injection (ICSI), depending on the indication.  
129 At our center, we perform IVF in cases of tubal factor or unexplained infertility, and ICSI in  
130 cases with a previous history of failed or suboptimal fertilization (fertilization rate <20%), and  
131 in cases with severe male factor infertility. All patients aged between 18 and 43 years could be  
132 included in the study.

133 We excluded women with polycystic ovarian syndrome, a history of cancer, and premature  
134 ovarian failure, since these pathologies could impact the FF microenvironment.

135 All patients had controlled ovarian stimulation (COS), using either the long agonist or the  
136 antagonist protocol. At our center, we offer the long agonist protocol in first line for patients  
137 with endometriosis, based on studies showing better pregnancy rates (Ma *et al.*, 2008; Kolanska  
138 *et al.*, 2017). Both recombinant and urinary gonadotropins were used, based on the treating

139 physician's discretion. All patients had serial ultrasound and blood monitoring, and when  $\geq 3$   
140 follicles  $\geq 17$  mm were noted, ovulation was triggered with 250  $\mu\text{g}$  recombinant HCG  
141 (Ovitrelle®, Merck, Lyon, France), and oocyte retrieval was performed under ultrasound  
142 guidance 36 hours later. Patients were enrolled during the morning of oocyte retrieval.

#### 143 **Embryo culture**

144 After IVF, embryos were cultivated in Global medium® (Life Global, Guilford, USA) under  
145 an atmosphere of  $\text{CO}_2$ . Embryos were observed 18 h post-fertilization to objectify the presence  
146 of the two pronuclei, and 48 h post-fertilization to objectify embryo cleavage. The embryos  
147 were scored at day 2 (48 h post-injection) according to the ESHRE consensus (ALPHA  
148 Scientists in reproductive medicine; ESHRE special interest group embryology, 2011) defining  
149 three groups of embryos, i.e. "good quality", "fair quality" or "poor quality" embryos.

#### 150 **FF samples**

151 Once the oocytes were isolated for fertilization and culture, FF samples were collected, pooled,  
152 and immediately centrifuged for 10 minutes at 3000 g at  $+4^\circ\text{C}$ . The supernatant was recovered  
153 and conserved at  $-80^\circ\text{C}$  in 500  $\mu\text{L}$  aliquots until the analysis.

#### 154 **Quantification of cytokines**

155 The cytokinome was determined in the FF by multiplex fluorescent-bead-based technology  
156 (Luminex 200™, Austin, TX), using two commercial Luminex screening assay kits (Bio-Plex  
157 Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay and Bio-Plex Pro Human Inflammation Panel 1, 37-plex  
158 Bio-Rad) from Bio-rad Laboratories (Marnes-la-Coquette, France), allowing the measurement  
159 of 59 cytokines (Supplementary table 1). Briefly, the FF samples were diluted two-fold before  
160 incubation with specific antibody-coated fluorescent beads according to the manufacturer's  
161 recommendations. After washing, 50 beads were analyzed with the Luminex 200™ analyzer



162 and Bio-Plex Manager software version 6, and the cytokine concentrations of the samples were  
163 estimated through serial dilution of cytokine standards.

#### 164 **Statistical analysis**

165 Cytokines concentrations were log-transformed before application of Student's test. Benjamini-  
166 Hochberg correction was applied to correct for type-I inflation due to test multiplicity, and to  
167 keep false discovery rate under 5%. All data were divided in two sets: training-validation (~ 2/3  
168 of all data) and test (~1/3 of all data) sets. Least Absolute Shrinkage and Selection Operator  
169 (LASSO) and logistic regression (LR) were used for model and variable selection in the  
170 training-validation set. To avoid selecting overfitted models, the predictive performance of the  
171 selected model was evaluated for predicting group allocation (i.e. endometriosis or control) of  
172 each sample of the test set. The area under the ROC curve (AUROC) and permutation test were  
173 used as a metric evaluating predictive capabilities of the multivariable models, with models  
174 having AUROC>0.8 considered as models with good predictive capabilities. This multivariate  
175 model integrates cytokines concentrations along with clinical variables acting as potential  
176 confounders (i.e., varying significantly between control and women suffering from  
177 endometriosis). More detailed information about the multivariate analysis is provided in Figure  
178 1 and Supplementary Material section.

179

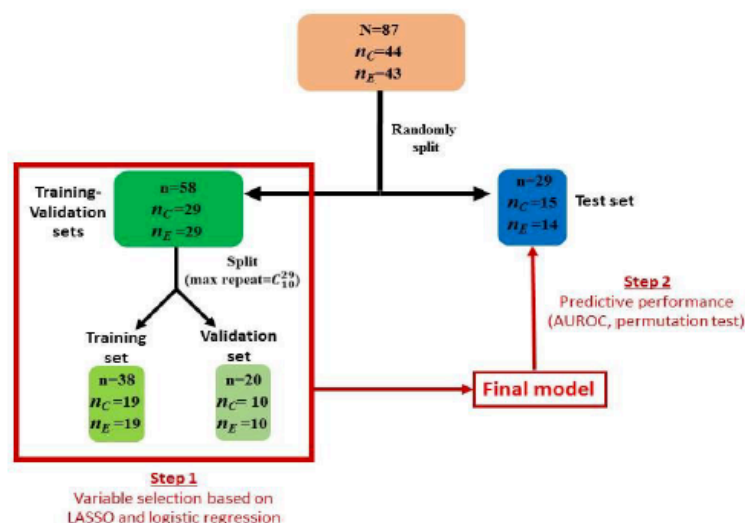
180

181

182

183

**Figure 1.** Multivariate analysis was conducted using training-validation (~ 2/3 of all data) and test sets (~1/3 of all data) strategy. Final model (containing variables selected in step 1) predictive capabilities were assessed in the test set to avoid validating overfitted models. Methods used in step 1 included LASSO then logistic regression. Best models here were selected as those yielding AUROC>0.95 in the validation set. Variables with no null estimated coefficients were included in a logistic regression model and submitted to a backward procedure. Finally, the best model obtained was applied to the test set to confirm its performance based on the AUROC. Coefficient in the logistic regression were estimated as median of the coefficient of the best models in step 1. Legend: nC, nE: number of patients in the control and endometriosis group, respectively; LASSO: Least Absolute Shrinkage and Selection Operator; LR: logistic regression.



## Supplementary material section

### Multivariate analysis

Data concerning cytokines concentration in the follicular fluid and several clinico-biological variables acting as potential confounding factors were taken from 44 controls and 43 patients with endometriosis and included in the analysis. Samples were randomly allocated to training-validation (controls=29 and endometriosis=29) or test sets (controls=15 and endometriosis=14). In the training-validation set, 19 patients from each group were used to build a model that was validated with the validation set containing the remaining 10 samples from each group. As far as the number of models that can be potentially built taking 19 samples out of 29 sums up to  $20'030'010$  or  $C_{10}^{29}$ , a matrix containing all these combinations on its columns was created and sampled every 910 columns which generated 22011 models, which according to us, is representative of all possible models and computationally feasible. Logistic regression (LR) cannot be directly applied to these sets or even to all 87 samples since the number of predictors (cytokines and clinico-biological variables) is very high and close to the number of samples, leading to convergence and collinearity issues. LASSO, however, can deal with these issues and variable selection can be carried out by imposing the nullity of some coefficients, though coefficient estimation using LASSO is not very robust. We used LASSO in the first step of variable selection leading to a reduction of the number of important variables that can be later included in a LR model with a robust estimation of coefficients. The initial LR model was then submitted with a backward procedure to keep only variables contributing significantly to group discrimination. The parameter used in model selection at each step (LASSO and LR) was the area under the ROC (AUROC) curve generated after applying the model built with the training set to the validation set. Then the LR model containing the selected variables was applied to the test set and the AUROC was

measured. The model was considered as predictive if the AUROC on the test set was greater than 0.8. We also evaluated the hypothesis of the equality between our final model and models obtained after randomly permuting the binary response vector (endometriosis or not) on the test set, while keeping fixed the data in the X matrix of the test set. In the case where our final model predicts (median AUC greater than 0.6) randomly obtained response vectors then it should be discarded as the hypothesis of the equality between our model and a random model (equivalent to a “flip a coin” model to decide whether a patient is affected by endometriosis or not) cannot be rejected.

## 184           **Results**

185   In total, 87 women undergoing IVF were included, 43 with severe endometriosis (endometriosis  
186   group) and 44 without endometriosis (control group). The patients' characteristics (age, body  
187   mass index (BMI), tobacco use, hormonal profile, antral follicle count) were comparable  
188   between the endometriosis and control groups (Table 1).

189   The baseline characteristics of cycles are described in Table I. As expected, significantly more  
190   patients received the long protocol in the endometriosis group compared to the control group  
191   ( $p < 0.001$ ). Moreover, in the endometriosis group, the total FSH dose received was significantly  
192   higher ( $2810 \pm 1072$  vs  $2375 \pm 900$  IU,  $p = 0.04$ ), and the total number of oocytes retrieved was  
193   significantly lower ( $8.8 \pm 7.0$  vs  $13.4 \pm 5.9$ ,  $p = 0.002$ ) than the control group. However, there  
194   was no difference in the fertilization rate and the rate of good embryos.

### 195   Cytokines analysis

196   Overall, the GM-CSF and IL5 levels obtained were uninterpretable (zero), so we ended up  
197   including 57 compounds in our final analysis.

#### 198   ♦ Univariate analysis

199   After Benjamini-Hochberg correction, the concentrations of nine cytokines (MCP-1, IL-6, IL-  
200   8, IL-1b, IL-5, chitinase 3-like 1, osteocalcin, MMP3 and FGF basic) were found to be  
201   significantly higher in the FF of patients with endometriosis compared to controls (Figure 2).

#### 202   ♦ Multivariate analysis

203   After applying the LASSO to the training-validation set, only two variables ("Downregulation  
204   protocol" and MCP-1) had non-null coefficients. Backward LR confirmed the importance of  
205   these two variables as the model with only one of these variables had significantly less

206 predictive capabilities compared to the complete model. Interaction between these variables  
207 was not retained as it only increased the model complexity without increasing the predictive  
208 capabilities. Histograms of AUROCs for the training and the validation set are represented in  
209 the figure 3A. The final LR model after logit transformation was:

210  $\text{LogitP (Endometriosis Downregulation protocol, sMCP-1)} = -2.50 + 2.53*(\text{Downregulation}$   
211  $\text{protocol}) + 2.04*(\text{MCP-1})$

212 It should be noted that MCP-1, as well as all other quantitative variables, were centered (null  
213 mean) and scaled to unit variance before the LASSO and LR.

214 When this model was applied to the test set, the AUROC obtained was 0.95 (Figure 3B).  
215 Permuting the response vector in the test set and applying the precedent LR model yielded  
216 predictions identical to those of the random model with null predictive capabilities (Figure 3C).

### 217 **Identification of two subgroups of patients**

218 While analyzing the MCP-1 levels in the FF of women with endometriosis, we noticed that  
219 some patients had levels equivalent to those of the control group, while others had significantly  
220 higher levels. Therefore, we subdivided the women in the endometriosis group into two  
221 subgroups based on the MCP-1 levels in the FF, using the maximal level found in the control  
222 group as the cutoff point: 350 pg/ml. We had two subgroups: MCP-1- group (n=23) had levels  
223 < 350pg/ml, and MCP-1+ group (n=20) had levels > 350 pg/mL (Figure 4). After Benjamini-  
224 Hochberg correction, the concentration of eleven cytokines (the same ones found different  
225 between the two groups, as well as GCSF, sTNF\_R1, BAFF, and osteocalcin) were found  
226 significantly higher in the FF of MCP-1+ patients compared to MCP-1- patients. The analysis  
227 of the inflammatory profile of these two subgroups, when compared to the control group,  
228 showed a dysregulation only in the MCP-1+ subgroup.



229 Moreover, the subgroup analysis showed a significantly lower number of oocytes retrieved (6  
230  $\pm 3.6$  vs  $11.3 \pm 8.3$ ,  $p=0.01$ ) and a significantly higher basal estradiol level ( $82.1 \pm 67.2$  vs  $32.6$   
231  $\pm 12.9$ ,  $p=0.002$ ) in the MCP-1+ group when compared to the MCP-1- group. The results were  
232 the same when comparing the MCP-1+ group to the control group ( $p<0.001$  for the two  
233 variables), but there were no differences between the MCP-1- and the control group. Finally,  
234 the number of top-quality embryos was lower in the MCP-1+ group (49%) compared to MCP-  
235 1- group (65%), but the difference was not statistically different ( $p=0.1$ )

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

**Table 1.** Baseline characteristics of patients and cycles.

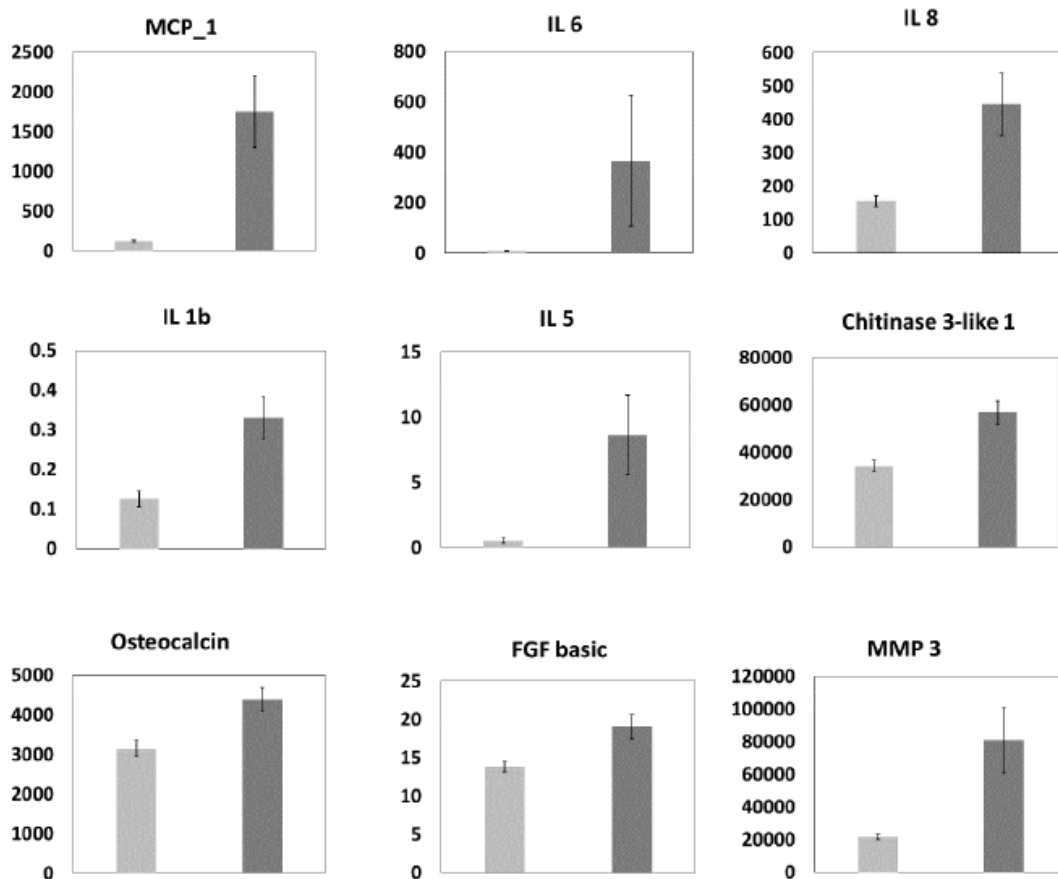
Variables		Endometriosis group (n=43)	Control group (n=44)	p-value
Age (years)		32.2 ± 3.9	31.4 ± 4.3	0.36
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )		23.1 ± 3.6	23.7 ± 4.0	0.46
Tobacco usage				0.62
Non-smoker		27	26	
Smoker		3	6	
Former smoker		10	11	
Information missing		3	1	
Baseline FSH (IU/L)		7.40 ± 3.21	8.60 ± 2.68	0.11
Serum Estradiol (pg/ml)		51.5 ± 48.4	36.2 ± 16.1	0.07
Baseline AMH (ng/mL)		2.8 ± 2.08	2.9 ± 1.9	0.78
Antral follicle count		17.6 ± 7.6	17.2 ± 6.8	0.80
Total dose of FSH per cycle (IU)		2810 ± 1072	2375 ± 900	0.04*
Stimulation protocol	Antagonist	23	43	< 0.001*
	Agonist	20	1	
Stimulation	FSH	32	35	0.57
	FSH+LH	11	9	
Treatment type	IVF	14	18	0.42
	ICSI	29	26	
Oocytes retrieved		8.8 ± 7.0	13.4 ± 5.9	0.002*
Embryos per oocytes retrieved (%)		53.5 ± 27.1	52.1 ± 24.5	0.72
Good quality embryos (%)		58.2 ± 31.5	58.5 ± 28.1	0.97

Data are expressed as n (%) percentage or mean +/- standard deviation.

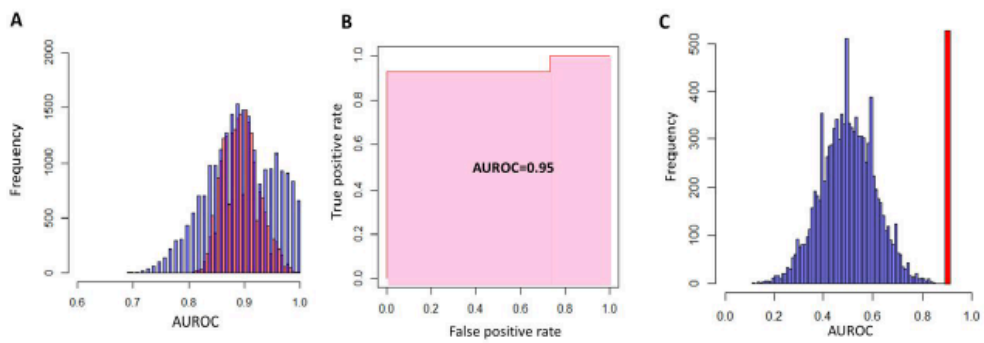
\* considered as significant p-value < 0.05.



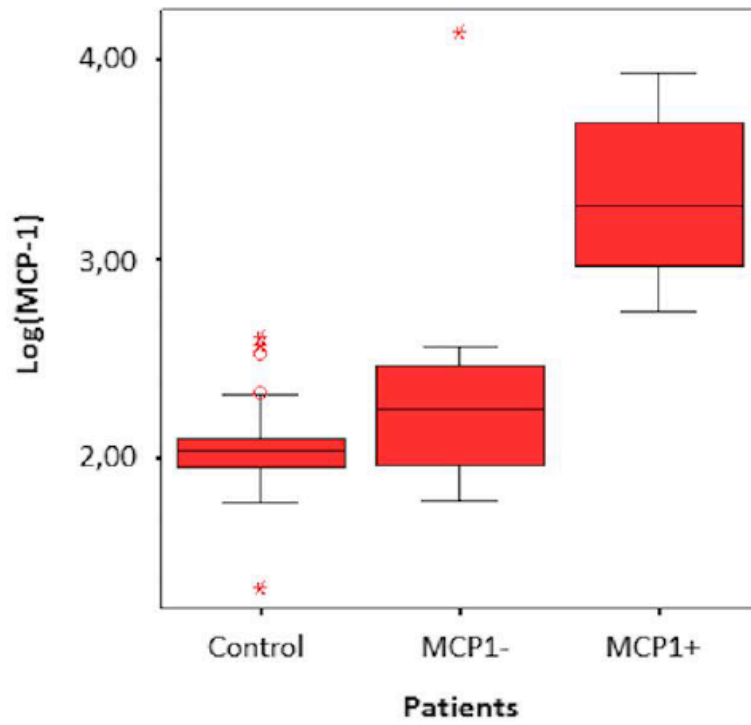
**Figure 2.** Bar plots representing the follicular fluid concentrations (pg/ml) of the nine cytokines found significantly different between endometriosis (dark gray) and control (light gray) patients. All patients (n=87) were included and data were log-transformed before Student test. Benjamini-Hochberg correction was applied to observed p-values for correction of risk I inflation. Error bars represent standard error of the mean (S.E.M).



**Figure 3A, 3B & 3C.** Performances of the LR models in the training-validation sets (A) and the test set (B and C). After LASSO, LR models with downregulation or stimulation protocol and MCP-1 as predictor variables were built and applied to the training and the validation sets. Histograms of AUROC show, as expected, good predictive performance of this models on the training set (red bars in A). Median AUROC in the validation sets was similar to the one found with the training set ( $\sim 0.90$ ) but exhibited more dispersion (blue bars in A). When the response vector in the test set was permuted, performance of the model was indistinguishable from that of the random model (median and mean AUROC equal to 0.5, blue bars in C) and very different for the predictive capability of the model on the original response vector (AUROC=0.95, red bar in C).



**Figure 4.** MCP-1 levels (following Log transformation) in the follicular fluid of patients with endometriosis (MCP-1- and MCP-1+ subgroups) and controls.



## 250 Discussion

251 The current study has shown an alteration of the cytokine profile in the follicular fluid of women  
252 with endometriosis, with high levels of MCP-1 linked to an alteration of the oocyte  
253 microenvironment.

254 Several studies have assessed the inflammatory profile of the peritoneal fluid, the  
255 ectopic implantation tissues, and the serum in women with endometriosis, and most have found  
256 a global cytokine activation, with an overexpression of both pro and anti-inflammatory  
257 cytokines (Couthino *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019). The most specific activated cytokines  
258 were IL6, TNF $\alpha$ , IL8, IL1 $\beta$ , MCP-1 and RANTES (Coutinho *et al.*, 2019). Based on these  
259 findings, we decided to analyze the inflammatory profile of the FF, since it is a direct reflection  
260 of the oocyte micro-environment, and plays a crucial role in the acquisition of gamete  
261 competence. However, to date, cytokine studies of FF have given conflicting results, probably  
262 due to the heterogeneity in the populations included and the cytokines analyzed (mostly less  
263 than ten), and the presence of several confounding factors (Hammadeh *et al.*, 2002; Malhotra  
264 *et al.*, 2012; Pellicer *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017). Indeed, many factors and  
265 comorbidities can impact the cytokines concentration in the FF, thus making the interpretation  
266 of the results and the assessment of the direct impact of endometriosis somewhat challenging.

267 In our study, we have analyzed 57 factors implicated in the immune and inflammatory response  
268 in 87 women undergoing IVF. The univariate analysis, after correction for the risk of type I  
269 error, has shown an overexpression of nine cytokines (figure 2). Out of these nine cytokines,  
270 three have already been shown to be increased in the FF (IL1  $\beta$  (Wu G *et al.*, 2017), IL6 (Pellicer  
271 *et al.*, 1998) and IL8 (Malhotra *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2016)), two in the peritoneal fluid  
272 (MCP-1 (Jorgensen *et al.*, 2017) and FGF (Rakhila *et al.*, 2016)) and one in the serum (Ural *et*  
273 *al.*, 2015) of women with endometriosis. The multivariate analysis (LASSO and logistic

274 regression) allowed us to assess the impact of endometriosis on the aforementioned cytokines  
275 while taking into account the potential bio-clinical confounding factors. Our model showed that  
276 the two most important variables in women with endometriosis were the downregulation  
277 protocol, and MCP-1 (figure 3), without any dependence between these two variables, thus  
278 confirming the importance of MCP-1 in endometriosis.

279 MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), also referred to as CCL2, is produced by different  
280 cells, such as endothelial cells, fibroblasts, and immune cells. It plays an important role in the  
281 regulation of the migration and infiltration of monocytes, basophiles, lymphocytes T and natural  
282 killer cells in many tissues, including the ovary (Deshmane *et al.*, 2009). Studies have shown a  
283 transient increase in the level of MCP-1 in the FF and the ovarian stroma at the time of ovulation  
284 (Dahm-Kähler *et al.*, 2009). MCP-1 could be implicated in follicular growth, ovulation, and the  
285 development as well as the regression of the corpus luteum (Dahm-Kähler *et al.*, 2006). These  
286 observations have led several researchers to investigate the role of MCP-1 in infertility. For  
287 instance, Younis *et al.* have shown an increase in the serum MCP-1 levels in women with  
288 polycystic ovarian syndrome, but found no alteration in women with unexplained infertility or  
289 moderate endometriosis before or during ovarian stimulation (Younis *et al.*, 2014). Other  
290 studies have shown an increase in MCP-1 levels in the peritoneal fluid of women with moderate  
291 and severe endometriosis (Borelli *et al.*, 2016; Jorgensen *et al.*, 2017). Buyuk *et al.* found  
292 increased serum and FF levels of MCP-1 in obese women undergoing IVF that were negatively  
293 correlated with pregnancy rates (Buyuk *et al.*, 2017). The authors postulated that the high levels  
294 of MCP-1 could negatively impact the follicular cells' function and the oocyte quality, by  
295 inducing an intracellular proinflammatory state via the activation of MCP-1 receptors or via an  
296 influx of monocytes towards the ovary.

297 Our study included only patients with severe endometriosis, but we identified two subgroups in  
298 this patient population: women with FF MCP-1 levels comparable to those in the control group

299 (MCP-1- group) and women with significantly higher levels (MCP-1+ group) (figure 4). We  
300 found that the cytokine profile was significantly altered in the MCP-1+ group compared to the  
301 MCP-1- and the control group, but we found no difference between the MCP-1- group and the  
302 control group. Moreover, there was a significantly higher basal serum estradiol levels and a  
303 significantly lower number of oocytes retrieved in the MCP-1+ group compared to the MCP-  
304 1- and the control groups. Even though some studies have shown an alteration of the estrogen  
305 metabolism in the endometriosis lesions (Zubrzycka *et al.*, 2015), serum estradiol levels are  
306 usually not modified in women with endometriosis (Coutinho *et al.*, 2019; Younis *et al.*, 2014).  
307 However, in our study, we found an increase in the basal serum estradiol levels in the MCP-1+  
308 subgroup, which could be due to an early follicular recruitment in these patients. Indeed, early  
309 recruitment is usually caused by a premature rise of FSH between two menstrual cycles,  
310 secondary to a decrease in the ovarian reserve, and is diagnosed by higher serum estradiol and  
311 FSH levels early in the cycle (Broekmans, 2009; Klein *et al.*, 1996). Therefore, the MCP-1+  
312 subgroup of patients could have early signs of premature ovarian insufficiency, even though  
313 the classic markers of ovarian reserve (Anti-Müllerian hormone, antral follicle count) are still  
314 within the normal range. This observation is further validated by the significantly lower number  
315 of oocytes retrieved in these patients despite the higher FSH doses used during controlled  
316 ovarian stimulation. In line with the report of Kitajima *et al.* (Kitajima *et al.*, 2014), these  
317 findings suggest that there is a more advanced form, or a specific subtype of endometriosis, that  
318 is associated with a significant local inflammation causing focal depletion of primordial  
319 follicles. The dysregulation of the cytokine profile can lead to a significant alteration of oocyte  
320 microenvironment, causing this more advanced or specific form of endometriosis.

321 In conclusion, we have found an important biologic heterogeneity in patients with  
322 endometriosis, with different levels of MCP-1 expression in the follicular fluid, and we have  
323 identified a specific subtype, with a high FF MCP-1 level, that is associated with a significant



324 alteration of the oocyte microenvironment. The existence of several subtypes of endometriosis  
325 could explain the conflicting results reported in previous studies. The follicular fluid level of  
326 MCP-1 could also be a potential biomarker of endometriosis, and further studies are needed to  
327 confirm its role as a potential predictor of the ovarian response to controlled ovarian stimulation  
328 in women with endometriosis.

329

### 330 **Authors' roles**

331 PEB, JM CB, PR and PMP, the principal investigators, take primary responsibility for the paper.  
332 PEB, JM CB, PR and PMP contributed to the conception, design and coordination of the  
333 research. PEB, GL and PD recruited the patients. PEB, JM CB, LB, SB, PJ, PR and PMP  
334 contributed to the collection and analysis of data. PEB, JM CB, HEH, PR and PMP contributed  
335 to writing the manuscript. PEB, JM CB, HEH, GL, PD, PR and PMP contributed to the revision  
336 of the article, and the final version was approved by all the authors.

### 337 **Acknowledgements**

338 None.

### 339 **Funding**

340 This work was supported by the University Hospital of Angers, the University of Angers, and  
341 the French national research centers, INSERM and CNRS.

### 342 **Conflict of interest**

343 None to declare.

344

345 **References**

- 346 ALPHA Scientists in reproductive medicine; ESHRE special interest group embryology.  
347 Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod*  
348 *Biomed Online* 2011;**22**:632-46.
- 349 Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization.  
350 *Fertil Steril* 2002;**77**:1148-55.
- 351 Borrelli GM, Kaufmann AM, Abrao MS, Mechsner S. Addition of MCP-1 and MIP-3 $\beta$  to the  
352 IL-8 appraisal in peritoneal fluid enhances the probability of identifying women with  
353 endometriosis. *J Reprod Immunol* 2015;**109**:66-73.
- 354 Bouet PE, Chao de la Barca JM, El Hachem H, Descamps P, Legendre G, Reynier P, May-  
355 Panloup P. Metabolomics shows no impairment of the microenvironment of the cumulus-  
356 oocyte complex in the follicular fluid of women with isolated endometriosis. *Reprod Biomed*  
357 *Online* 2019 Aug 12 (epub ahead of print).
- 358 Broekmans FJ. Testing for ovarian reserve in assisted reproduction programs: the current point  
359 of view. *Facts Views Vis Obgyn* 2009;**1**: 9-87.
- 360 Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med* 2009;**360**:268-79.
- 361 Buyuk E, Asemota OA, Merhi Z, Charron MJ, Berger DS, Zapantis A, Jindal SK. Serum and  
362 follicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 levels are elevated in obese women and are  
363 associated with poorer clinical pregnancy rate after in vitro fertilization: a pilot study. *Fertil*  
364 *Steril* 2017;**107**:632-40.
- 365 Coutinho LM, Ferreira MC, Rocha AL, Carneiro MM, Reis FM. New biomarkers in  
366 endometriosis. *Adv Clin Chem* 2019;**89**:59-77.

- 367 Cordeiro FB, Cataldi TR, Perkel KJ, do Vale Teixeira da Costa L, Rochetti RC, Stevanato J,  
368 Eberlin MN, Zylbersztejn DS, Cedenho AP, Lo Turco EG. Lipidomics analysis of follicular  
369 fluid by ESI-MS reveals potential biomarkers for ovarian endometriosis. *J Assist Reprod Genet*  
370 2015;**32**:1817-25.
- 371 Da Broi MG, Giorgi VSI, Wang F, Keefe DL, Albertini D, Navarro PA. Influence of follicular  
372 fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *J Assist Reprod Genet*  
373 2018;**35**:735-51.
- 374 Dahm-Kahler P, Ghahremani M, Lind AK, Sundfeldt K, Brannstrom M. Monocyte chemotactic  
375 protein-1 (MCP-1), its receptor, and macrophages in the perifollicular stroma during the human  
376 ovulatory process. *Fertil Steril* 2009;**91**:231-9.
- 377 Dahm-Kahler P, Runesson E, Lind AK, Brannstrom M. Monocyte chemotactic protein-1  
378 (MCP-1) in the follicle of the menstrual and IVF cycle. *Mol Hum Reprod* 2006;**12**:1-6.
- 379 Deshmane SL, Kremley S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-  
380 1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009;**29**:313-26.
- 381 ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF labs, De Los Santos MJ, Apter S, Coticchio  
382 G, Debrock S, Lundin K, Plancha CE, Prados F, Rienzi L, Verheyen G, Woodward B *et al.*  
383 Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. *Hum Reprod* 2016;**31**:685-6.
- 384 Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*  
385 1994;**50**:225-232.
- 386 Karaer A, Tuncay G, Mumcu A, Dogan B. Metabolomics analysis of follicular fluid in women  
387 with ovarian endometriosis undergoing in vitro fertilization. *Syst Biol Reprod Med* 2019;**65**:39-  
388 47.

- 389 Kitajima M, Dolmans MM, Donnez O, Masuzaki H, Soares M, Donnez J. Enhanced follicular  
390 recruitment and atresia in cortex derived from ovaries with endometriomas. *Fertil Steril*  
391 2014;**101**:1031-7.
- 392 Klein NA, Battaglia DE, Fujimoto VY, Davis GS, Bremner WJ, Soules MR. Reproductive  
393 aging: accelerated ovarian follicular development associated with a monotropic follicle-  
394 stimulating hormone rise in normal older women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;**81**:1038-45.
- 395 Kolanska K, Cohen J, Bendifallah S, Selleret L, Antoine JM, Chabbert-Buffet N, Darai E,  
396 d'Argent EM. Pregnancy outcomes after controlled ovarian hyperstimulation in women with  
397 endometriosis-associated infertility: GnRH-agonist versus GnRH-antagonist. *J Gynecol Obstet*  
398 *Hum Reprod* 2017;**46**:681-6.
- 399 Harb HM, Gallos ID, Chu J, Harb M, Coomarasamy A. The effect of endometriosis on in vitro  
400 fertilisation outcome: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2013;**120**:1308-20.
- 401 Hauzmann EE, Garcia-Velasco JA, Pellicer A. Oocyte donation and endometriosis : what  
402 are the lessons? *Semin Reprod Med* 2013;**31**:173-7.
- 403 Jorgensen H, Hill AS, Beste MT, Kumar MP, Chiswick E, Fedorcsak P, Isaacson KB,  
404 Lauffenburger DA, Griffith LG, Qviqstad E. Peritoneal fluid cytokines related to  
405 endometriosis in patients evaluated for infertility. *Fertil Steril* 2017;**107**:1191-1199.
- 406 Lo Turco EG, Cordeiro FB, Lopes PH, Gozzo FC, Pilau EJ, Soler TB, da Silva BF, Del Giudice  
407 PT, Bertolla RP, Fraietta R *et al*. Proteomic analysis of follicular fluid from women with and  
408 without endometriosis: new therapeutic targets and biomarkers. *Mol Reprod Dev*  
409 2013;**80**:441-50.

410 Ma C, Qiao J, Liu P, Chen G. Ovarian suppression treatment prior to in-vitro fertilization and  
411 embryo transfer in Chinese women with stage III or IV endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet*  
412 2008;**100**:167-70.

413 Macer ML, Taylor HS. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and  
414 treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am*  
415 2012;**39**:535-49.

416 Marianna S, Alessia P, Susan C, Francesca C, Angela S, Francesca C, Antonella N, Patrizia I,  
417 Nicola C, Emilio C. Metabolomic profiling and biochemical evaluation of the follicular fluid  
418 of endometriosis patients. *Mol Biosyst* 2017;**13**:1213-22.

419 Rakhila H, Al-Akoum M, Bergeron ME, Leboeuf M, Lemyre M, Akoum A, Pouliot M.  
420 Promotion of angiogenesis and proliferation cytokines patterns in peritoneal fluid from women  
421 with endometriosis. *J Reprod Immunol* 2016;**116**:1-6.

422 Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid  
423 content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol*  
424 *Endocrinol* 2009;**7**:40.

425 Rossi AC, Prefumo F. The effects of surgery for endometriosis on pregnancy outcomes  
426 following in vitro fertilization and embryo transfer: a systematic review and meta-analysis.  
427 *Arch Gynecol Obstet* 2016;**294**:647-55.

428 Sanchez AM, Vanni VS, Bartiromo L, Papaleo E, Zilberberg E, Candiani M, Orvieto R, Vignani  
429 P. Is the oocyte quality affected by endometriosis? A review of the literature. *J Ovarian Res*  
430 2017;**10**:43.

431 Schenken RS, Guzick DS. Revised endometriosis classification: 1996. *Fertil Steril*  
432 1997;**67**:815-6.



433 Sun Z, Song J, Zhang X, Wang A, Guo Y, Yang Y, Wang X, Xu K, Deng J. Novel SWATHMS  
434 technology for follicular fluid metabolomics in patients with endometriosis. *Pharmazie*  
435 2018;**73**:318-23.

436 Ural UM, Tekin YB, Cüre M, Sahin FK. Serum YKL-40 levels as a novel marker of  
437 inflammation in patients with endometriosis. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2015;**42**:495-7.

438 Wellbery C. Diagnosis and treatment of endometriosis. *Am Fam Physician* 1999;**60**:1753-62.

439 Yang C, Geng Y, Li Y, Chen C, Gao Y. Impact of ovarian endometrioma on ovarian  
440 responsiveness and IVF: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*  
441 2015;**31**:9-19.

442 Younis A, Hawkins K, Mahini H, Butler W, Garelnabi M. Serum tumor necrosis factor- $\alpha$ ,  
443 interleukin-6, monocyte chemoattractant protein-1 and paraoxonase-1 profiles in women with  
444 endometriosis, PCOS, or unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet* 2014;**31**:1445-51.

445 Zhou WJ, Yang HL, Shao J, Mei J, Chang KK, Zhu R, Li MQ. Anti-inflammatory cytokines in  
446 endometriosis. *Cell Mol Life Sci* 2019;**76**:2111-2132.

447 Zubrzycka A, Zubrzycki M, Janecka A, Zubrzycka M. New horizons in the etiopathogenesis  
448 and non-invasive diagnosis of endometriosis. *Curr Mol Med* 2015;**15**:697-713.

449

450

451

452

453



# L'analyse métabolomique du fluide folliculaire (FF) et du profil cytokinique chez des femmes ayant une réserve ovarienne diminuée

## 1. Recherche de biomarqueurs par analyse métabolomique ciblée du FF chez des femmes ayant une réserve ovarienne diminuée

Le vieillissement ovarien résulte à la fois d'un déclin qualitatif mais aussi quantitatif de la réserve ovarienne (12). Cliniquement, le vieillissement ovarien est caractérisé par une réserve ovarienne diminuée (ROD) objectivée par des marqueurs tels que la diminution de l'AMH, l'élévation de la FSH et la diminution du CFA. Des études ciblées antérieures ont rapporté des variations de concentrations de certains métabolites dans le FF de femmes âgées de plus de 40 ans ou de patientes ayant une ROD (41-43) et la modification de métabolites clés impliqués dans le métabolisme énergétique de l'ovocyte (44). Des différences du profil protéomique (45) et de profil lipidique (46-47) ont aussi été mises en évidence.

Dans notre étude, nous avons émis l'hypothèse d'un possible impact global du vieillissement ovarien et d'une ROD sur le métabolome du FF.

### Principaux résultats

Nous avons analysé le FF de 28 femmes ayant une ROD caractéristique d'un vieillissement ovarien comparé à l'analyse du FF de 29 femmes ayant une réserve ovarienne normale (RON, population contrôle).

L'âge moyen des patientes était significativement plus bas dans le groupe RON que dans le groupe ROD. Comme attendu, les valeurs moyenne d'AMH, de FSH et du CFA sont significativement différentes entre les 2 groupes. De plus, le nombre moyen de complexes cumulo-ovocytaires (CCO) récupérés lors de la ponction était significativement plus faible dans le groupe ROD. Les doses totales moyennes de FSH utilisés étaient significativement plus élevées dans le groupe ROD.

Cent trente-six métabolites ont été retenus pour l'analyse statistique.

Après ACP, le diagramme de dispersion des données métabolomiques issues du FF ne montraient pas de regroupement en fonction du groupe RON ou du groupe ROD

Une signature métabolique, basée sur la méthode OPLS-DA, a permis d'obtenir un modèle discriminant les 2 groupes. Cette signature était principalement caractérisée par une diminution significative des phosphatidylcholine plasmalogènes (PCP) et des acides gras polyinsaturés (PUFAae) dans le FF des patientes ROD comparé aux concentrations retrouvées dans le FF des patientes RON. L'autre approche multivariée utilisant le modèle LASSO retrouvait 3 variables significatives : la somme des acides gras polyinsaturés (PUFA ae), les ratios DiMéthylArginine (DMA) totale/Arginine et UnsaturatedFattyAcid/SaturatedFattyAcid. Un ratio DMA totale/arginine bas retrouvé dans le groupe ROD pourrait être la conséquence d'une activité réduite de la protéine arginine méthyltransférase (PRMT) au cours du vieillissement ovarien.

Le modèle de régression logistique final contenait 3 variables indépendantes : PUFAae, DMA totale/Arginine et l'âge de la patiente. Ceci souligne l'importance de la signature métabolique en distinguant les patientes ROD de patientes RON indépendamment de l'âge de la patiente. A la fois le modèle OPLS-DA et le modèle LASSO-LR soulignaient le rôle joué par les PCP en distinguant les patientes ROD des RON.

## Conclusion

Globalement nos résultats mettent en évidence un impact du vieillissement ovarien sur la composition du FF avec une chute des plasmalogènes insaturés et une augmentation de l'activité méthyl transférase chez les femmes avec une ROD. Ce profil pourrait être lié à une augmentation du stress oxydant dans le FF au cours du vieillissement. Des analyses complémentaires, utilisant notamment des techniques non ciblées permettront de compléter nos résultats et de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la diminution de la réserve ovarienne.

Ces résultats ont été publiés dans *Human Reproduction* (IF = 5.5) en 2018.

# Targeted metabolomics reveals reduced levels of polyunsaturated choline plasmalogens and a smaller dimethylarginine/arginine ratio in the follicular fluid of patients with a diminished ovarian reserve

J.M. Chao de la Barca<sup>1,2</sup>, T. Boueilh<sup>3</sup>, G. Simard<sup>1,4</sup>, L. Boucret<sup>2,3</sup>,  
V. Ferré-L'Hotellier<sup>3</sup>, L. Tessier<sup>1</sup>, C. Gadras<sup>1</sup>, P.E. Bouet<sup>5</sup>,  
P. Descamps<sup>5</sup>, V. Procaccio<sup>1,2</sup>, P. Reynier<sup>1,2</sup>, and P. May-Panloup<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Département de Biochimie et Génétique, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, 49933 Angers Cedex 9, France <sup>2</sup>Institut MITOVASC, CNRS 6015, INSERM U1083, Université d'Angers, Angers, France <sup>3</sup>Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, 49933 Angers Cedex 9, France <sup>4</sup>INSERM U1063, Université d'Angers, Angers, France <sup>5</sup>Service de Gynécologie-Obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, 49933 Angers Cedex 9, France

\*Correspondence address. Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, 49933 Angers Cedex 9, France. E-mail: pamaypanloup@chu-angers.fr

Submitted on April 11, 2017; resubmitted on September 1, 2017; accepted on September 13, 2017

**STUDY QUESTION:** Does the metabolomic profile of the follicular fluid (FF) of patients with a diminished ovarian reserve (DOR) differ from that of patients with a normal ovarian reserve (NOR)?

**SUMMARY ANSWER:** The metabolomic signature of the FF reveals a significant decrease in polyunsaturated choline plasmalogens and methyl arginine transferase activity in DOR patients compared to NOR patients.

**WHAT IS KNOWN ALREADY:** The composition of the FF reflects the exchanges between the oocyte and its microenvironment during its acquisition of gametic competence. Studies of the FF have allowed identification of biomarkers and metabolic pathways involved in various pathologies affecting oocyte quality, but no large metabolomic analysis in the context of ovarian ageing and DOR has been undertaken so far.

**STUDY DESIGN, SIZE, DURATION:** This was an observational study of the FF retrieved from 57 women undergoing in vitro fertilization at the University Hospital of Angers, France, from November 2015 to September 2016. The women were classified in two groups: one including 28 DOR patients, and the other including 29 NOR patients, serving as controls.

**PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS:** Patients were enrolled in the morning of oocyte retrieval after ovarian stimulation. Once the oocytes were isolated for fertilization and culture, the FF was pooled and centrifuged for analysis. A targeted quantitative metabolomic analysis was performed using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, and the Biocrates Absolute IDQ p180 kit. The FF levels of 188 metabolites and several sums and ratios of metabolic significance were assessed by multivariate and univariate analyses.

**MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE:** A total of 136 metabolites were accurately quantified and used for calculating 23 sums and ratios. Samples were randomly divided into training and validation sets. The training set, allowed the construction of multivariate statistical models with a projection-supervised method, i.e. orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), applied to the full set of metabolites, or the penalized least absolute shrinkage and selection operator with logistic regression (LASSO-LR), applied to the ratios and sums of the metabolites. Both multivariate models showed good predictive performances when applied to the validation set.

The final penalized model retained the three most significant variables, i.e. the total dimethylarginine-to-arginine ratio (Total DMA/Arginine), the sum of the polyunsaturated choline plasmalogens (PUFA ae), and the patient's age. The negative coefficients of Total DMA/Arginine and PUFA ae indicated that these FF variables had lower values in DOR patients than in NOR patients.

**LARGE SCALE DATA:** N/A.

**LIMITATIONS REASONS FOR CAUTION:** This study presents two limitations. First, with this targeted metabolomics analysis, we have explored only a limited portion of the FF metabolome. Second, although the signature found was highly significant, the mechanism underlying the dysfunction remains undetermined.

**WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS:** The understanding of the mechanisms implied in ovarian ageing is essential for providing an adequate response to affected women desiring pregnancy. Our study proposes an incoming signature that may open new paths towards this goal.

**STUDY FUNDING/COMPETING INTEREST(S):** This study was supported by the University Hospital of Angers, the University of Angers, and the French national research centers, INSERM and the CNRS. There were no competing interests.

**Key words:** choline plasmalogens / diminished ovarian reserve / follicular fluid / metabolomics / total dimethylarginine

## Introduction

Ovarian ageing is one of the common causes of infertility (<http://presse.inserm.fr/les-troubles-de-la-fertilite-etat-des-connaissances-et-pistes-pour-la-recherche-2/6060/>) with almost 20% of patients consulting for infertility showing signs of premature ovarian ageing (Devine et al., 2015). However, assisted reproductive technology is frequently inefficient in these cases. It is therefore essential to understand the pathophysiological mechanisms of ovarian ageing so as to provide adequate counseling to affected women desiring pregnancy.

Ovarian ageing results in both the quantitative and qualitative decline of the ovarian oocyte reserve (te Velde and Pearson, 2002). Clinically, ovarian ageing is characterized by a diminished ovarian reserve (DOR) objectified by markers such as the decrease in the anti-Müllerian hormone (AMH), the increase in the FSH, and the decrease in the antral follicle count (AFC). Women with DOR also present impaired oocyte competence, resulting in an increase of embryonic aneuploidies (Haadsma et al., 2010; van der Stroom et al., 2011; Katz-Jaffe et al., 2013), fertilization failure (Lekamge et al., 2007), high rates of pregnancy loss (Levi et al., 2001; Lekamge et al., 2007), as well as poor response to ovarian stimulation, and reduced chances of pregnancy with IVF (Bancsi et al., 2002; Nikolaou and Templeton, 2003).

Oocyte competence to support embryonic development is acquired within the ovarian follicle. The structure of the ovarian follicle evolves during folliculogenesis and, from the tertiary stage, the follicle comprises an antrum filled with follicular fluid (FF). The FF is produced both by the transfer of blood plasma components across the blood follicular barrier, by secretions of the theca and the granulosa cells, and by molecules excreted by the oocyte (Fortune, 1994). The composition of the FF, reflects the exchanges contributing to the acquisition of oocyte competence and has been associated with oocyte quality, embryonic development and the fertility of women (Revelli et al., 2009). In this context, it has been suggested that the FF should be searched for biomarkers of oocyte maturity, fecundity, and embryonic viability (Basuino and Silveira, 2016). Omics technologies, i.e. genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics and fluxomics, which allow the detection of large sets of molecules in a single experiment, have been used to identify potential biomarkers in the FF

(McRae et al., 2012). The integrated analysis of 'omics' data, obtained from several FF studies, has also enabled the identification of specific markers or pathways underlying certain pathologies, such as endometriosis (Cordeiro et al., 2015a) or polycystic ovary syndrome (Atiomo and Daykin, 2012; Sun et al., 2012; Cordeiro et al., 2015b).

Previous targeted studies have reported variations of some specific metabolites in the FF from older women or patients with reduced ovarian reserve, including an increase of the advanced glycation end-product (AGE) (Fujii and Nakayama, 2010; Tatone et al., 2011; Stensen et al., 2014) and the modification of key metabolites implied in the energetic metabolism of the oocyte (Pacella et al., 2012). Differences in the proteomics profile (Hashemitarbar et al., 2014) and the lipidomics profile (Von Wald et al., 2010; Cataldi et al., 2013) have also been evidenced. Here, we hypothesized a possible global impact of ageing and DOR on the metabolome of the FF. To address this question, we conducted a targeted metabolomics study, measuring 188 metabolites using mass spectrometry on the FF from 28 women with ovarian ageing characterized by DOR and 29 women with a normal ovarian profile (NOR) serving as controls.

## Materials and Methods

### Characteristics of the patients

FF was obtained from 57 patients, 28 with a DOR and 29 with a normal ovarian reserve (NOR), all undergoing IVF with or without ICSI at the ART centre of the University Hospital of Angers, France, between November 2015 and September 2016. The criteria used for classifying the patients into the DOR or NOR groups included the levels of AMH, FSH and estradiol, as well as the results of ovarian ultrasonography and the antral follicle count (AFC) (de Carvalho et al., 2008). Except for the AMH assays, all of the other dosages and ultrasonography examinations were performed on Day 3 of a spontaneous ovarian cycle. Patients were considered to belong to the NOR group if they had AMH levels above two ng/ml, FSH levels below eight IU/l, estradiol levels below 60 pg/ml, and an AFC above four per ovary. Patients were considered to belong to the DOR group if they had AMH levels below two ng/ml or an AFC below five per ovary. Since there is no consensus concerning the definition of DOR, the classification used here was based on our centre



specific data, as advocated by the Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2015).

All of the women included in the study had two ovaries, with no history of ovarian surgery, or any autoimmune disease or gonadotoxic treatment that might have contributed to a DOR. Patients with polycystic ovary syndrome or endometriosis were excluded.

The characteristics of these 57 patients as well as the procedures used for the suppression of pituitary gonadotrophin release [using: Cetrorelix (Cetroside<sup>®</sup>; Merck-Serono, Geneva, Switzerland); Ganirelix (Orgalutran<sup>®</sup>; Organon, Oss, Netherlands); or Triptorelin (Decapeptyl<sup>®</sup>; Ipsen Pharma, Paris, France)] and follicular growth stimulation [using uFSH + uLH: Menotropine (Menopur<sup>®</sup>; Ferring Pharmaceuticals, Copenhagen, Denmark); rFSH and rLH: Follitropine alpha + Lutropine alpha (Pergoveris<sup>®</sup>; Merck-Serono, Geneva, Switzerland); rFSH: Follitropine alpha (Gonal-f<sup>®</sup>; Merck-Serono, Geneva, Switzerland) or Follitropine beta (Puregon<sup>®</sup>; Organon, Oss, Netherlands)] are summarized in Table I. In each case, ovulation was induced with Ovitrelle<sup>®</sup> (Choriogonadotropin alfa, Merck-Serono, Geneva, Switzerland), and the oocytes were retrieved transvaginally under ultrasound guidance 36 h after administration of human chorionic gonadotropin. The oocyte retrieval was performed in the morning under general anesthesia, which required patients to be in the fasting state. The oocytes were isolated from the FF for fertilization (IVF or ICSI) and culture. The remaining FF was pooled for each patient and immediately centrifuged at 800 g for 10 min to remove erythrocytes and leukocytes. The supernatant was collected and maintained frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

## Metabolomics analyses

Targeted quantitative metabolomics analyses were carried out using the Biocrates<sup>®</sup> Absolute IDQ p180 kit (Biocrates Life sciences AG, Innsbruck, Austria). This kit, combined with a QTRAP 5500 mass spectrometer (SCIEX, Villebon-sur-Yvette, France), enabled quantification of up to 188 different endogenous molecules: free carnitine and 39 acylcarnitines; 21 amino acids; 21 biogenic amines; the sum of hexose and 90 lipids, comprising 14 lysophosphatidylcholines, 38 diacyl-phosphatidylcholines (referred to as PC aa), and 38 choline plasmalogens (ChoPls) (referred to as PC ae); and 15 sphingomyelins (referred to as SM). The full list of individual metabolites is available at <http://www.biocrates.com/products/research-products/absoluteidq-p180-kit>. Flow injection analysis coupled with tandem mass spectrometry (FIA-MS/MS) was used for the analysis of carnitines, acylcarnitines, lipids and sugar, whereas liquid chromatography (LC) was used for separating amino acids and biogenic amines before quantitation with MS.

All reagents used in this analysis were of LC-MS grade and purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France) and Merck (Molsheim, France). Sample preparation was performed following the Kit User Manual. Briefly, each FF was thoroughly vortexed after thawing and centrifuged at  $4^{\circ}\text{C}$  for 5 min at 5000 g. For each sample, 10  $\mu\text{l}$  was then added to the centre of the filters placed on the upper wells of the 96-well plate. Metabolites were extracted in a methanol solution using ammonium acetate after drying the filter spot under nitrogen flow and derivatizing with phenylisothiocyanate for the quantitation of amino acids and biogenic amines. The extracts were finally diluted with MS running solvent before FIA and LC-MS-MS analysis. One blank sample (with no internal standard or sample added), three water-based zero samples (internal standards added and phosphate buffered saline as a 'zero' sample), and three quality control (QC) samples were also added to the plate of the kit. Three QCs composed of human plasma samples at three concentration levels: low (QC1), medium (QC2) and high (QC3), were used to evaluate the performance of the analytical assay. A seven-point serial dilution of calibrators was added to the plate of

the kit to generate calibration curves for the quantification of amino acids and biogenic amines.

In addition to the information gathered from individual metabolites, several sums and ratios, with metabolic significance in a wide range of disorders belonging to the metabolic disease spectrum, were calculated using the RatioExplorer module provided by Biocrates<sup>®</sup> (Table II).

## Statistical analyses

The univariate statistical analysis of the data of the patients was done using the non-parametric Mann-Whitney test for quantitative variables and the chi-squared test ( $\chi^2$ ) for qualitative variables. No corrections for Type I error inflation were used. All the calculations were done with Systat software, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

Raw data were first examined in order to eliminate metabolites not accurately measured, i.e. when  $>20\%$  of metabolite concentration values were out of the dynamic range. The univariate analysis of metabolomic data was done using the non-parametric Mann-Whitney test for comparisons involving two independent samples. Fisher's exact test was used for testing the null hypothesis of independence of the rows and columns in the confusion matrices. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ . All univariate analyses involving metabolomics data were done with R software, version 3.2.1 (<http://www.Rproject.org>).

## Multivariate analysis

In order to evaluate the generalizability of model predictions, the data were randomly split in a training set containing about two-thirds of all the data (e.g. 20 NOR and 20 DOR patients) and a test set containing about one-third of the data (e.g. nine NOR and eight DOR patients). Multivariate analyses were performed on the training set and the prediction capabilities of this model were evaluated on the independent test set. First, principal components analysis (PCA) was used on the training set to detect sample groups and outliers. Then, OPLS-DA, which is a supervised pattern recognition method, was performed to maximize the variation between groups and to determine the variables contributing to this variation. Multivariate analyses for the PCA and OPLS-DA models were performed using mean-centered and unit variance-scaled (MC-UV) data. The quality of the models was validated using two parameters:  $R^2$  (goodness of fit) and cumulated  $Q^2$  ( $Q^2_{\text{cum}}$ , goodness of prediction). A threshold of 0.5 was used to identify good ( $Q^2_{\text{cum}} \geq 0.5$ ) or poor ( $Q^2_{\text{cum}} < 0.5$ ) predictive capabilities in the models created with the training set using cross-validation (Eriksson et al., 2006). In order to avoid over-fitting, superfluous variables based on VIP (Variable Importance for the projection) and loading values (see below) were eliminated from the initial model using a backward procedure. The risk of over-fitting and robustness for the final model constructed in the training set was assessed by the intercept of the permutation plot and the cross-validated ANOVA (CV-ANOVA), respectively. This intercept reflects the predictive capabilities ( $\text{perm}Q^2$ ) of a model having the same number of components (or latent variables) and the same  $X_{\text{training}}$  matrix (metabolites) but a randomly permuted  $Y_{\text{training}}$  vector (scrambled  $Y_{\text{training}}$ ) of response variables, i.e. there is no correlation at the intercept between the original  $Y_{\text{training}}$  vector and the permuted  $Y_{\text{training}}$  vector. Non-over-fitted models have negative  $\text{perm}Q^2$  value (MKS Umetrics, 2013). In the CV-ANOVA test, the CV-predicted residuals using the OPLS model are compared, using an ANOVA test, to the residuals obtained as a variation around the  $Y_{\text{training}}$  average. When the null hypothesis of equality of the two residuals ( $F$ -test) cannot be rejected ( $P$ -value  $> 0.05$  here), the equality of the OPLS and a random model cannot be rejected (Eriksson et al., 2008). In the model with the best predictive capabilities, key variables were highlighted on the basis of the variable importance for the

**Table 1** Characteristics of patients.

Covariates	Overall (n = 58)	NOR (n = 29)	DOR (n = 28)	P-value
Age of patients (years) mean (SD)	33.16 (5.19)	29.76 (4.16)	36.68 (3.58)	<0.001* Mann-Whitney
Body mass index mean (SD)	23.56 (5.15)	23.17 (5.48)	23.97 (4.84)	0.40 Mann-Whitney
Addiction to smoking				
Non-smoker (n)	36	17	19	0.32 Khi-deux
Smoker (n)	18	10	8	
Former smoker (n)	2	2	0	
Information missing (n)	1	0	1	
E2 baseline (pg/ml) mean (SD)	40.51 (20.35)	41.54 (16.62)	39.44 (23.88)	0.380 Mann-Whitney
FSH baseline (UI/l) mean (SD)	8.07 (2.97)	7.07 (1.99)	9.11 (3.47)	0.01* Mann-Whitney
LH baseline (UI/l) mean (SD)	5.05 (2.26)	4.62 (1.96)	5.53 (2.49)	0.186 Mann-Whitney
AMH baseline (ng/ml) mean (SD)	2.38 (1.70)	3.73 (1.23)	0.94 (0.56)	<0.001* Mann-Whitney
Antral follicle count mean (SD)	14.26 (7.56)	19.74 (6.57)	8.58 (2.82)	<0.001* Mann-Whitney
Total dose of FSH (UI) Mean (SD)	2605 (1165)	1746 (548)	3496 (942)	<0.001* Mann-Whitney
LH suppression				
Agonist	3	2	1	0.57 Khi-deux
Antagonist	54	27	27	
Stimulation				
FSH	46	25	21	0.28 Khi-deux
FSH + LH	11	4	7	
Number of retrieved OCCs Mean (SD)	8.67 (6.22)	11.72 (6.80)	5.50 (3.46)	<0.001* Mann-Whitney

\*Significant at  $P < 0.05$ .

projection (VIP), and loading values scaled as correlation coefficients ( $p_{corr}$ ). VIP values summarize the importance of each variable for the OPLS-DA model, while loadings are indicators of the relationship between  $Y_{training}$  vector (NOR or DOR class) and  $X_{training}$  variables (matrix of measured metabolites in the training set). Variables having a VIP value greater than one are considered to be important for group discrimination in predictive models (Eriksson et al., 2006). Plotting VIP versus  $p_{corr}$  values ('volcano' plot) enabled highlighting important variables in PLS models. Multivariate data analysis was conducted using SIMCA-P v.14.0 (Umetrics, Umeå, Sweden). To evaluate the generalizability of the predictions made by the model created with the training set, this model was applied to the test set ( $X_{test}$ ) and the predicted responses (NOR or DOR) obtained ( $Y_{pred, test}$ ) were compared to the actual responses ( $Y_{test}$ ) using Fisher's exact test.

We performed a LASSO (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator) logistic regression (LASSO-LR) on the MC-UV scaled ratios or sum of metabolites for the training set. With this method, a constraint or penalty is imposed to the coefficients of the 'classic' logistic regression in order to render the variance-covariance matrix invertible thus enabling the computation of variance estimate for the regression coefficients (Tibshirani, 1996). This method is considered as a variable selection method since some coefficients are shrunk toward exactly zero under the constraint. We then applied a logistic regression model with a backward selection procedure and minimization of the Akaike information criterion to the variables having no null coefficient after the LASSO-LR. Indeed, the coefficients estimated in LASSO-LR are biased because of the penalty whereas the coefficients estimated after LR are not biased, enabling the calculation of risk measurements from coefficients such as odds ratios (OR). Finally, the model obtained by LR was applied to the MC-UV scaled ratios or sum of metabolites in the test set to measure its capacity to

predict the outcome (NOR or DOR) in a new data set. Fisher's exact test was used to test the independence between the predicted and actual outcomes under the null hypothesis. LASSO-LR and LR were performed using the R packages *glmnet* and *glm*, respectively (<http://www.Rproject.org>).

### Ethical approval

All participants gave their written informed consent and the collection of samples was approved by the Ethical Committee of the University Hospital of Angers, France (Number DC-2014-2224).

## Results

### Characteristics of patients

As expected, since plasma AMH, AFC and FSH levels were the criteria initially used for classifying the patients into the DOR and NOR groups, the values of the AMH and the AFC were significantly lower whereas that of the FSH was significantly higher in the DOR group compared to the NOR group of patients. In addition, the mean number of OCCs retrieved was lower in the DOR group than in the NOR group of patients (Table 1). Not surprisingly, the doses of FSH required for the stimulation phase were significantly higher in the DOR group than in the NOR group of patients. However, there was no significant difference between the two groups of patients with respect to the drugs used for LH suppression and ovarian stimulation (Table 1).

The mean age was significantly lower in the NOR group than in the DOR group of patients. However, there were no significant



**Table II** Ratios or sums of metabolites selected for their potential metabolic significance.

Ratio or sum	Metabolic significance
Sum of branched-chain amino acids (BCAA)	Indicator of short-term metabolic control (analogy with muscular insulin resistance)
Sum of selected glycolytic amino acids (alanine, glycine, serine) (GAA)	Indicator of balance between glycolysis and gluconeogenesis
Ratio of asymmetrically dimethylated arginine to total unmodified arginine (ADMA/Arg)	Inhibition of nitric oxide synthase (NOS)
Ratio of total dimethylated arginine to total unmodified arginine (Total DMA/Arg)	Activity of PRMT
Ratio of citrulline to arginine (Cit/Arg)	Activity of NOS
Ratio of citrulline to ornithine (Cit/Orn)	Activity of ornithine carbamoylphosphate transferase
Ratio of ornithine to arginine (Orn/Arg)	Activity of arginase
Ratio of tyrosine to phenylalanine (Tyr/Phe)	Activity of phenylalanine hydroxylase
Ratio of sulfoxidized methionine to total unmodified methionine (Met-SO/Met)	Measure of systemic oxidative stress
Ratio of kynurenine to tryptophan (Kyn/Trp)	Rate of Trp degradation to niacin (immunosuppression/tolerance)
Ratio of serotonin to tryptophan (Serotonin/Trp)	Rate of Trp degradation to serotonin
Ratio of putrescine to ornithine (Putrescine/Orn)	Activity of ornithine decarboxylase
Ratio of spermidine to putrescine (Spermidine/Putrescine)	Activity of spermidine synthase
Ratio of spermine to spermidine (Spermine/Spermidine)	Activity of spermine synthase
Ratio of acetylcarnitine to free carnitine (C2/C0)	Measure of $\beta$ -oxidation of even numbered fatty acids (FA)
Ratio of short chain acylcarnitines to free carnitine ((C2 + C3)/C0)	Measure of overall $\beta$ -oxidation activity
Ratio of long chain acylcarnitines to free carnitine ((C16 + C18)/C0)	Activity of carnitine palmitoyltransferase I
Ratio of dicarboxy-acylcarnitines to total acylcarnitines (Total AC-DC/Total AC)	Indicator of $\omega$ -oxidation of FA.
Sum of saturated FA in diacyl PC (SFA aa)	Indicator of lipid composition of PC aa
Sum of saturated FA in choline plasmalogens PC (SFA ae)	Indicator of lipid composition of PC ae
Sum of mono-unsaturated FA in diacyl PC (MUFA aa)	Indicator of lipid composition and the activity of desaturases on diacyl PC
Sum of mono-unsaturated FA in choline plasmalogens (MUFA ae)	Indicator of lipid composition and the activity of desaturases on choline plasmalogens
Sum of polyunsaturated FA in diacyl PC (PUFA aa)	Indicator of lipid composition and the activity of desaturases on diacyl PC
Sum of polyunsaturated FA in choline plasmalogens (PUFA ae)	Indicator of lipid composition and the activity of desaturases on choline plasmalogens
Ratio of unsaturated to saturated FA in diacyl PC (UFA/SFA aa)	Measure of the global activity of desaturases on diacyl PC
Ratio of unsaturated to saturated FA in choline plasmalogens (UFA/SFA ae)	Measure of the global activity of desaturases on choline plasmalogens
Ratio of lyso-phosphatidylcholines to phosphatidylcholines (Total LysoPC/ Total PC)	Indicator of phospholipase activity

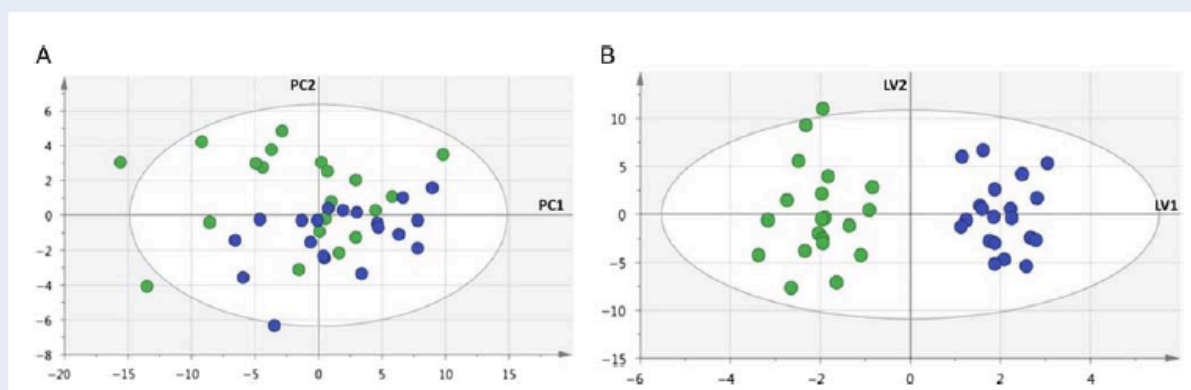
differences between the two groups in terms of the BMI or addiction to tobacco smoking, which are factors known to affect the ovarian reserve (Table I).

### Metabolomics analyses

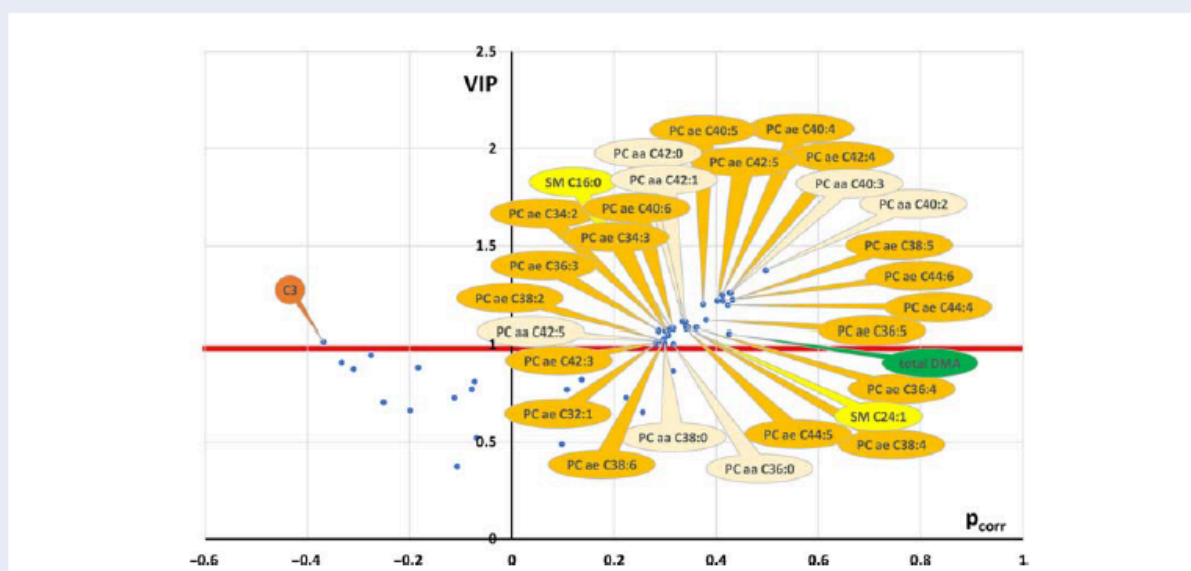
After validation of the plate based on QC samples (data not shown), 136 (72.3%) metabolites were retained for statistical analyses. From the 27 ratios or sums of metabolites (see Table II), 23 were finally calculated since the metabolites used for the computation of the remaining four ratios, i.e. the ratios of symmetric dimethylarginine (SDMA), sulfoxidized methionine (Met-SO), hexadecanoylcarnitine (C16) and octadecanoylcarnitine (C18), and serotonin, were not accurately measured. Raw data with the full list of metabolites, as well as their ratios and sums, are shown in Supplementary Tables SI and SII, respectively.

The PCA scatter plot of metabolomics data from the FF in the training set showed no grouping according to the NOR or DOR groups nor any strong outliers in the first principal plan (PC1 vs. PC2) (Fig. 1A). The OPLS-DA model provided a good fit for the data ( $R^2X = 0.62$ ,  $R^2Y = 0.92$ ) and showed good predictive capability ( $Q^2_{cum} = 0.76$ ), with a low risk of over-fitting ( $permQ^2 = -0.97$ , CV-ANOVA < 0.0001). A clear discrimination between the DOR and NOR groups along the predictive component (LV1) was apparent in the scatter plot of the OPLS-DA model (Fig. 1B).

The best discriminant metabolites ( $VIP \geq 1$  and high absolute  $p_{corr}$  values) included those related to lipid metabolism, mainly polyunsaturated ChoPIs (PUFA ae), with lower concentrations in the FF of DOR patients (Fig. 2). Indeed, 26 of the 30 (87%) metabolites with  $VIP \geq 1$  belong to the phosphatidylcholine (PC) class, which represents 36.7% of the 71 PCs included in the analysis. More than half of the PCs (53%)



**Figure 1** PCA (A) and OPLS-DA (B) scatter plots obtained from the matrix of metabolites for the 40 patients in the training set. The green circles represent DOR patients; the blue circles represent NOR patients. The PCA scatter plot shows no clearly distinguished trend and the two DOR patients outside the tolerance ellipse are not strong outliers according to Hotelling's T2 range. The OPLS-DA scatter plot shows the sharp distinction between the two groups of patients. PC1,2: Principal Components 1 and 2; LV1,2: Latent Variables 1 and 2.



**Figure 2** Volcano plot ( $p_{corr}$  vs. VIP) from the OPLS-DA analysis of the training set. Only the 30 metabolites with  $VIP \geq 1$  are labeled. Remarkably, the metabolic signature was mostly composed of 19 unsaturated choline plasmalogens (PC ae, dark orange bubbles) being relatively lower in the FF from DOR patients. Other important metabolites, based on VIP and  $p_{corr}$  values, were seven diacyl PCs (PC aa, light orange bubbles), two sphingomyelins (SM, yellow bubbles), propionyl-carnitine (C3, brown bubble), and total dimethylarginine (total DMA, green bubble). For phosphatidylcholines (PC), the sum of the length of the two acyl groups is noted after the C and is followed by the number of double bonds, e.g. PC ae C42:4 represents a choline plasmalogen where the length of the two acyl chains and the number of double bonds correspond to 42 and 4, respectively. The same notation is used for representing the length and the number of double bonds in the acyl chain of sphingomyelins (SM).

with  $VIP \geq 1$  were ChoPIs, and 19 of the 25 (76%) PUFA ChoPIs measured were considered to be important in discriminating between the FF from NOR and DOR patients. Interestingly, the signature encompasses neither any amino acids, nor lysophosphatidylcholine or hexose, and only one acyl-carnitine (propionyl-carnitine or C3,  $VIP = 1.01$ ).

When applied to the test set, the OPLS-DA model correctly predicted five of the eight DOR cases (62.5%), and 8 of the nine NOR cases (88.9%),  $P$ -value = 0.043.

After LASSO, only three variables without null coefficients, i.e. Total DMA/Arg, UFA/SFA ae and PUFA ae, were included in the full logistic

regression model. We have added the age of the patient as a variable in the model since the DOR patients were significantly older than the NOR patients. A logistic regression model containing these variables and their first-order interaction was then submitted to a backward elimination procedure. The final LR model after the logit transformation was given by:

$$\text{Logit } P(Y \text{ training} = \text{DOR} | \text{MC-UV scaled ratios, sums and age}) \\ = 0.11 - 2.46(\text{PUFA ae}) - 0.77(\text{Total DMA/Arg}) + 3.15(\text{Age})$$

Here, the negative coefficients indicate that the probability of the patient having a DOR decreases with the increase in these ratios or sums. Although ORs can be directly calculated from this model, the mean centering of the data and UV scaling complicate this task. When this model was applied to the test set, 7 of the 8 (87.5%) DOR cases and all 9 (100%) NOR cases were correctly predicted ( $P$ -value < 0.001). Thus, according to the results for the OPLS-DA and LR models on the test set, the latter appears to offer greater specificity and sensitivity.

Box plots for the two ratios and the sums of polyunsaturated choline plasmalogens (PUFA ae) calculated for the 29 NOR and 28 DOR patients are represented in Figure 3.

The direct correlations between the three variables retained and the markers of ovarian ageing are shown in Supplementary Table SIII. We found significant positive correlations between the three variables retained and two of the markers conventionally used for the evaluation of the ovarian reserve of the patients, i.e. AMH and AFC. In addition, positive correlations were also found between these three variables and the number of OCCs retrieved, which, by definition, is lower in DOR patients.

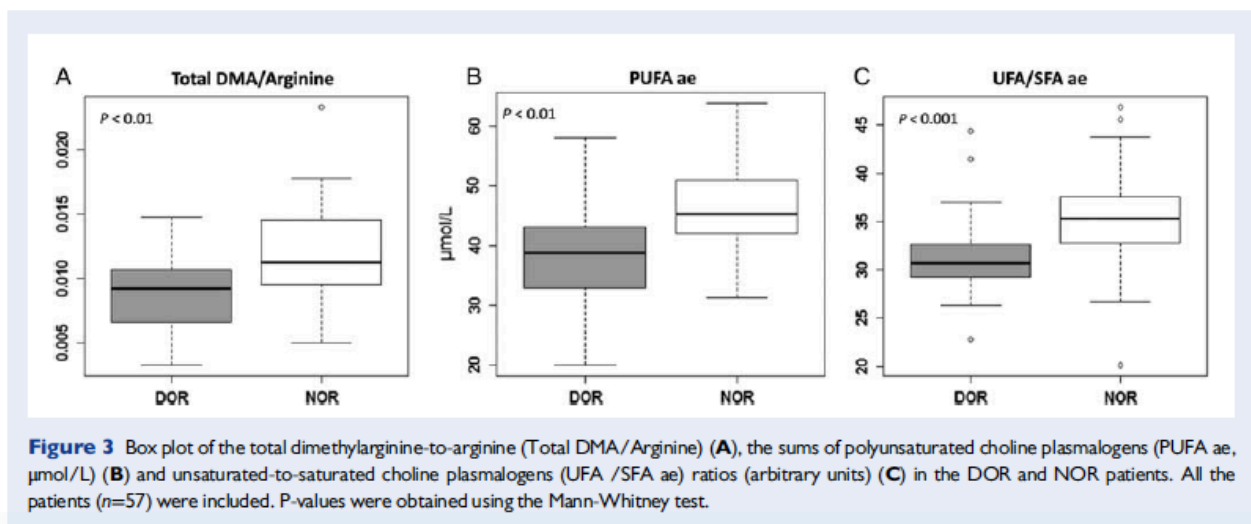
## Discussion

The metabolic signature, based on the OPLS-DA method, was mainly characterized by decreased polyunsaturated ChoPIs or PUFA ae in the FF of the DOR patients compared to that of the NOR patients. The other multivariate approach using LASSO yielded a sparse model with only three non-zero coefficients, i.e. the sum of PUFA ae and the ratios

of Total DMA to Arginine, and UFA to SFA ae. In order to calculate non-biased coefficients and to study first-order interactions, we used these variables in a logistic regression model including the patient's age as a confounding factor in the relationship between the variables retained and the NOR or DOR classes of patients. The final LR model contained three variables with no interactions, i.e. PUFA ae, the total DMA/Arginine ratio and the patient's age. This emphasizes the importance of the metabolic signature in distinguishing between DOR and NOR patients, independently of the patients' age. Both the OPLS-DA and the LASSO-LR models highlighted the role played by the polyunsaturated ChoPIs, in distinguishing between NOR and DOR patients. However, the LASSO-LR model outperformed the OPLS-DA model certainly in relation to the inclusion of the patient's age in this model and the greater complexity of the OPLS-DA model (with more variables than the LASSO model, leading to some over-fitting and thus to a poorer performance in the test set) and because the LASSO-LR model was more parsimonious since each sum or ratio captured information from several metabolites. Interestingly, AMH and AFC, as well as the number of oocytes retrieved, were positively correlated with the three variables retained by our analysis (Supplementary Table SIII).

ChoPIs along with plasmalocholines belong to the chemical family of ether-linked glycerophospholipids, a family that is completed mainly by their 'ethanolamine counterparts', i.e. ethanolamine plasmalogens (EtPIs) and plasmalyethanolamines (Snyder *et al.*, 2002). Human plasma Pls, which are synthesized in the peroxisomes of the liver, intestine and kidney, are secreted into the blood as lipoprotein components (Braverman and Moser, 2012). In spite of numerous studies on the biochemical composition of FF, including some metabolomics and lipidomics studies, the detection and quantitation of Pls in the FF has not been investigated so far (Nandi *et al.*, 2007; Revelli *et al.*, 2009; Collado-Fernandez *et al.*, 2012; Cataldi *et al.*, 2013). Follicular Pls probably come from plasma high-density lipoproteins, the only class of lipoproteins described in the FF, since other lipoprotein particles are too large and are excluded by the follicular basal lamina (Suchanek *et al.*, 1988).

The functions of the Pls are not fully understood but may be related to their antioxidant activity, related to the vinyl ether moiety of their



**Figure 3** Box plot of the total dimethylarginine-to-arginine (Total DMA/Arginine) (A), the sums of polyunsaturated choline plasmalogens (PUFA ae, µmol/L) (B) and unsaturated-to-saturated choline plasmalogens (UFA /SFA ae) ratios (arbitrary units) (C) in the DOR and NOR patients. All the patients ( $n=57$ ) were included. P-values were obtained using the Mann-Whitney test.



alkenyl chain, which has the ability to scavenge oxygen radicals (Broniec et al., 2011). Their protective role has been evidenced in mutant cells deficient in the biosynthesis of PIs (Zoeller et al., 1999) as well as by the enrichment of lipoproteins and liposomal membranes with PIs that increase their oxidative resistance (Engelmann et al., 1994). Interestingly, a marked decrease in serum plasmalogen levels with ageing has been reported to be potentially linked with a redox imbalance (Maeba et al., 2007). One hypothesis is that the diminution of polyunsaturated ChoPIs in the FF of patients with ovarian ageing may be related to oxidative stress leading to excessive consumption of these molecules. This would corroborate previous studies showing, associated with ageing or DOR, increased oxidative stress in ovarian follicular environment (Carbone et al., 2003; Elizur et al., 2014; Nuñez-Calonge et al., 2016).

PIs can also act as reservoir for important polyunsaturated lipid mediators such as arachidonic acid or docosahexaenoic acid linked at the sn-2 position of the glycerol backbone and released from PIs under the action of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Maeba et al., 2015). The diminution of PIs in the FF of DOR patients could be a consequence of their increased consumption because of the greater activity of PLA<sub>2</sub> during ageing, as described in brain tissue (André et al., 2006). Interestingly, increased PLA<sub>2</sub> activity has also been found in the FF containing oocytes that were not fertilizable by ICSI (Ciepiela et al., 2015), suggesting a link between impaired oocyte quality and PLA<sub>2</sub> activity.

Multivariate analysis also showed the relevance of the total dimethylated arginine to unmodified arginine ratio (Total DMA/Arg) in discriminating between the FF of NOR and DOR patients. Interestingly, this ratio was conversely correlated with the FSH level notably in DOR patients. The lower Total DMA/Arg ratio found in the FF of DOR patients could be a consequence of the reduced activity of protein arginine methyltransferases (PRMTs) during ovarian ageing. Interestingly, a recent review indicates that the loss of PRMTs in transgenic mice is associated with cellular senescence and premature ageing (Blanc et al., 2017).

PRMTs catalyze the symmetric or asymmetric methylation of arginine residues, (Badhand, 2007) and arginine methylation is a common post-translational modification playing a key role in gene expression, chromatin-based processes and epigenetic control. Hence, PRMTs are of particular importance for germinal cell development, oocyte quality and embryogenesis (Torres-Padilla et al., 2007; Stein et al., 2012; Kim et al., 2014; Baumann et al., 2015). Moreover, low levels of PRMT1 have been associated with high rates of spontaneous DNA damage and aneuploidies whereas the total loss of PRMT1 in PRMT1-null mice has led to preimplantation embryonic lethality (Yu et al., 2009; Gurunathan et al., 2015). DOR is associated with impaired oocyte quality resulting in embryonic aneuploidies (Haadsma et al., 2010; van der Stroom et al., 2011; Katz-Jaffe et al., 2013), fertilization failure (Lekamge et al., 2007), and pregnancy loss (Levi et al., 2001; Lekamge et al., 2007). Our results support the hypothesis that altered oocyte quality in this context and its consequences could be related to a decreased expression of the PRMTs in the follicular environment associated with DOR. Overall, our study shows the impact of ovarian ageing on the composition of the FF, with a distinct signature of polyunsaturated ChoPIs and methyl transferase activity. Whereas these compounds have been associated in the literature with aging and more or less directly with oocyte quality, it is premature to elaborate physiopathological hypotheses on this basis. But interestingly, at least in serum the decrease of PLs during ageing has been linked with redox

imbalance associated with decreased activity of the peroxisome-activated receptor gamma co-activator-1 $\alpha$  (Maeba et al., 2007), a master regulator of metabolism that is notably activated by PRMTs (Teyssier et al., 2005).

In conclusion, these results call for further evaluation of the role of PRMTs and plasmalogens in ovarian ageing, perhaps by the use of broader, non-targeted metabolic analyses of FF, notably in view of a better understanding of the role played by other lipids, such as the ethanolamine plasmalogens, and their relationship to choline plasmalogens. Further studies will be needed to explore the pathways in which these compounds are involved, as well as their possible links with each other, to fully elucidate their involvement in the pathophysiology of DOR.

## Supplementary data

Supplementary data are available at *Human Reproduction* online

## Acknowledgement

We are grateful to Kanaya Malkani for his critical reading and comments on the manuscript.

## Authors' roles

J.M.C.d.I.B., P.R. and P.M.-P., the principal investigators, take primary responsibility for the paper. J.M.C.d.I.B., T.B., G.S., P.R. and P.M.-P. contributed to the conception, design and coordination of the research. P.E.B. and P.D. recruited the patients. J.M.C.d.I.B., T.B., L.B., V.F.-L.H., L.T., C.G., V.P., P.R. and P.M.-P. contributed to the collection and analysis of data. J.M.C.d.I.B., T.B., G.S., P.R. and P.M.-P. contributed to writing the manuscript. J.M.C.d.I.B., T.B., G.S., P.R. and P.M.-P. contributed to the revision of the article, and the final version was approved by all the authors.

## Funding

The University Hospital of Angers, the University of Angers, France, and the French national research centers, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

## Conflict of interest

None to dedared.

## References

- André A, Juanéda P, Sébédio JL, Chardigny JM. Plasmalogen metabolism-related enzymes in rat brain during aging: influence of n-3 fatty acid intake. *Biochimie* 2006;**88**:103–111.
- Atiomo W, Daykin CA. Metabolomic biomarkers in women with polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Mol Hum Reprod* 2012;**18**:546–553.
- Bachand F. Protein arginine methyltransferases: from unicellular eukaryotes to humans. *Eukaryot Cell* 2007;**6**:889–898.
- Bancsi LJMM, Broekmans FJM, Eijkemans MJC, Jong FH, de Habbema JDF, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization:

- a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002;**77**:328–336.
- Basuino L, Silveira CF. Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assist Reprod* 2016;**20**:38–40.
- Baumann C, Olson M, Wang K, Fazleabas A, De La Fuente R. Arginine methyltransferases mediate an epigenetic ovarian response to endometriosis. *Reproduction [Internet]* 2015;**150**:297–310.
- Blanc RS, Vogel G, Li X, Yu Z, Li S, Richard S. Arginine methylation by PRMT1 regulates muscle stem cell fate. *Mol Cell Biol* 2017;**37**:e00457–16.
- Braverman NE, Moser AB. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2012;**1822**:1442–1452.
- Broniec A, Klosinski R, Pawlak A, Wrona-Krol M, Thompson D, Sarna T. Interactions of plasmalogens and their diacyl analogs with singlet oxygen in selected model systems. *Free Radic Biol Med* 2011;**50**:892–898.
- Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R, Amicarelli F. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod* 2003;**9**:639–643.
- Cataldi T, Cordeiro FB, da Costa LDVT, Pflau EJ, Ferreira CR, Gozzo FC, Eberlin MN, Bertolla RP, Cedenho AP, Lo Turco EG. Lipid profiling of follicular fluid from women undergoing IVF: young poor ovarian responders versus normal responders. *Hum Fertil* 2013;**16**:269–277.
- Ciepiela P, Bączkowski T, Drozd A, Kazienko A, Stachowska E, Kurzawa R. Arachidonic and linoleic acid derivatives impact oocyte ICSI fertilization—a prospective analysis of follicular fluid and a matched oocyte in a 'one follicle—one retrieved oocyte—one resulting embryo' investigational setting. In Kues WA, editor. *PLoS One* 2015;**10**:e0119087.
- Collado-Fernandez E, Picton HM, Dumollard R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *Int J Dev Biol* 2012;**56**:799–808.
- Cordeiro FB, Cataldi TR, Perkel KJ, do Vale Teixeira da Costa L, Rochetti RC, Stevanato J, Eberlin MN, Zylbersztein DS, Cedenho AP, Lo Turco EG. Lipidomics analysis of follicular fluid by ESI-MS reveals potential biomarkers for ovarian endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 2015a;**32**:1817–1825.
- Cordeiro FB, Cataldi TR, Vale Teixeira da Costa L, do, Lima CB, de, Stevanato J, Zylbersztein DS, Ferreira CR, Eberlin MN, Cedenho AP, Lo Turco EG. Follicular fluid lipid fingerprinting from women with PCOS and hyper response during IVF treatment. *J Assist Reprod Genet* 2015b;**32**:45–54.
- de Carvalho BR, Rosa e Silva AC, Rosa e Silva JC, dos Reis RM, Ferriani RA, Silva de Sá MF. Ovarian reserve evaluation: state of the art. *J Assist Reprod Genet* 2008;**25**:311–322.
- Devine K, Mumford SL, Wu M, DeCherney AH, Hill MJ, Propst A. Diminished ovarian reserve in the United States assisted reproductive technology population: diagnostic trends among 181,536 cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System. *Fertil Steril* 2015;**104**:612–619.e3.
- Elizur SE, Lebovitz O, Orvieto R, Dor J, Zan-Bar T. Reactive oxygen species in follicular fluid may serve as biochemical markers to determine ovarian aging and follicular metabolic age. *Gynecol Endocrinol* 2014;**30**:705–707.
- Engelmann B, Bräutigam C, Thiery J. Plasmalogen phospholipids as potential protectors against lipid peroxidation of low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun [Internet]* 1994;**204**:1235–1242.
- Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Trygg J, Wikström C, Wold S. *Multi- and Megavariate Data Analysis- Part I: Basic Principles and Applications*. Umeå: MKS Umetrics AB, 2006. editor.
- Eriksson L, Trygg J, Wold S. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS® models. *J Chemom* 2008;**22**:594–600.
- Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994;**50**:225–232.
- Fujii EY, Nakayama M. The measurements of RAGE, VEGF, and AGEs in the plasma and follicular fluid of reproductive women: the influence of aging. *Fertil Steril* 2010;**94**:694–700.
- Gurunathan G, Yu Z, Coulombe Y, Masson J-Y, Richard S. Arginine methylation of hnRNPUL1 regulates interaction with NBS1 and recruitment to sites of DNA damage. *Sci Rep* 2015;**5**:10475.
- Haadisma ML, Groen H, Mooij TM, Burger CW, Broekmans FJ, Lambalk CB, Leeuwen FE, van, Hoek A, OMEGA Project Group. Miscarriage risk for IVF pregnancies in poor responders to ovarian hyperstimulation. *Reprod Biomed Online* 2010;**20**:191–200.
- Hashemitabar M, Bahmanzadeh M, Mostafaei A, Orazizadeh M, Farimani M, Nikbakht R. A proteomic analysis of human follicular fluid: comparison between younger and older women with normal FSH levels. *Int J Mol Sci* 2014;**15**:17518–17540.
- Katz-Jaffe MG, Surrey ES, Minjarez DA, Gustofson RL, Stevens JM, Schoolcraft WB. Association of abnormal ovarian reserve parameters with a higher incidence of aneuploid blastocysts. *Obstet Gynecol* 2013;**121**:71–77.
- Kim S, Günesdogan U, Zyllicz JJ, Hackett JA, Cougot D, Bao S, Lee C, Dietmann S, Allen GE, Sengupta R et al. PRMT5 protects genomic integrity during global DNA demethylation in primordial germ cells and pre-implantation embryos. *Mol Cell* 2014;**56**:564–579.
- Lekame DN, Barry M, Kolo M, Lane M, Gilchrist RB, Tremellen KP. Anti-Müllerian hormone as a predictor of IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2007;**14**:602–610.
- Levi AJ, Raynault MF, Bergh PA, Drews MR, Miller BT, Scott RT. Reproductive outcome in patients with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril* 2001;**76**:666–669.
- Maeba R, Maeda T, Kinoshita M, Takao K, Takenaka H, Kusano J, Yoshimura N, Takeoka Y, Yasuda D, Okazaki T et al. Plasmalogens in human serum positively correlate with high-density lipoprotein and decrease with aging. *J Atheroscler Thromb* 2007;**14**:12–18.
- Maeba R, Nishimukai M, Sakasegawa S, Sugimori D, Hara H. Plasma/Serum Plasmalogens: methods of analysis and clinical significance. *Adv Clin Chem* 2015;**70**:31–94.
- McRae C, Baskind NE, Orsi NM, Sharma V, Fisher J. Metabolic profiling of follicular fluid and plasma from natural cycle in vitro fertilization patients—a pilot study. *Fertil Steril* 2012;**98**:1449–57.e6.
- MKS Umetrics. User Guide to SIMCA-13. 2013;319.
- Nandi S, Kumar VG, Manjunatha BM, Gupta PSP. Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. *Dev Growth Differ* 2007;**49**:61–66.
- Nikolaou D, Templeton A. Early ovarian ageing: a hypothesis. Detection and clinical relevance. *Hum Reprod* 2003;**18**:1137–1139.
- Núñez-Calonge R, Cortés S, Gutierrez Gonzalez LM, Kireev R, Vara E, Ortega L, Caballero P, Rancan L, Tresguerres J. Oxidative stress in follicular fluid of young women with low response compared with fertile oocyte donors. *Reprod Biomed Online* 2016;**32**:446–456.
- Pacella L, Zander-Fox DL, Armstrong DT, Lane M. Women with reduced ovarian reserve or advanced maternal age have an altered follicular environment. *Fertil Steril* 2012;**98**:986–994.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril* 2015;**103**:e9–e17.
- Reveli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;**7**:40.
- Snyder F, Lee T, Wykle RL. Chapter 9 Ether-linked lipids and their bioactive species. *New Compr Biochem* 2002;**36**:233–262.
- Stein C, Riedl S, Rühnick D, Nötzold RR, Bauer U-M. The arginine methyltransferase PRMT6 regulates cell proliferation and senescence through



- transcriptional repression of tumor suppressor genes. *Nucleic Acids Res* 2012;**40**:9522–9533.
- Stensen MH, Tanbo T, Storeng R, Fedorcsak P. Advanced glycation end products and their receptor contribute to ovarian ageing. *Hum Reprod* 2014;**29**:125–134.
- Suchanek E, Simunić V, Kopjar B, Mačas E, Grizelj V, Salzer B, Stavljenić A. Lipid and lipoprotein contents of human follicular fluid. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988;**26**:543–547.
- Sun L, Hu W, Liu Q, Hao Q, Sun B, Zhang Q, Mao S, Qiao J, Yan X. Metabonomics reveals plasma metabolic changes and inflammatory marker in polycystic ovary syndrome patients. *J Proteome Res* 2012;**11**:2937–2946.
- Tatone C, Heizenrieder T, Di Emidio G, Treffon P, Amicarelli F, Seidel T, Eichenlaub-Ritter U. Evidence that carbonyl stress by methylglyoxal exposure induces DNA damage and spindle aberrations, affects mitochondrial integrity in mammalian oocytes and contributes to oocyte ageing. *Hum Reprod* 2011;**26**:1843–1859.
- Teyssier C, Ma H, Emter R, Kralli A, Stallcup MR. Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1 by arginine methylation. *Genes Dev* 2005;**19**:1466–1473.
- te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update* 2002;**8**:141–154.
- Tibshirani R. Regression shrinkage and selection Via the Lasso. *J R Stat Soc Ser B* 1996;**58**:267–288.
- Torres-Padilla M-E, Parfitt D-E, Kouzarides T, Zemicka-Goetz M. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 2007;**445**:214–218.
- van Stroom EMC, der König TE, van Dulmen-den Broeder E, Elzinga WS, van Montfrans JM, Haadsma ML, Lambalk CB. Early menopause in mothers of children with Down syndrome? *Fertil Steril* 2011;**96**:985–990.e1.
- Von Wald T, Monisova Y, Hacker MR, Yoo SW, Penzias AS, Reindollar RR, Usheva A. Age-related variations in follicular apolipoproteins may influence human oocyte maturation and fertility potential. *Fertil Steril* 2010;**93**:2354–2361.
- Yu Z, Chen T, Hébert J, Li E, Richard S. A mouse PRMT1 null allele defines an essential role for arginine methylation in genome maintenance and cell proliferation. *Mol Cell Biol* 2009;**29**:2982–2996.
- Zoeller RA, Lake AC, Nagan N, Gaposchkin DP, Legner MA, Lieberthal W. Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem J* 1999;**338**:769–776.



## 2. Recherche d'un profil cytokinique dans le FF de femmes ayant une réserve ovarienne diminuée

### 2.1. Introduction

Le dialogue paracrine intra-folliculaire favorise et régule le microenvironnement du complexe cumulo-ovocytaire en soutenant les compétences développemental et méiotique de l'ovocyte (48-50). Ce dialogue implique notamment des cytokines qui sont de petites protéines responsables de la signalisation cellulaire dans différentes voies physiologiques ou pathologiques. A l'intérieur du follicule ovarien, les cytokines sécrétées régulent les fonctions ovariennes à différents niveaux : la prolifération cellulaire, la stéroïdogenèse, l'angiogenèse et le développement ovocytaire (48).

Plusieurs cytokines et facteurs de croissance intra-folliculaires aurait un impact positif significatif sur la qualité ovocytaire, sur le taux de fécondation, sur le développement embryonnaire et sur les issues de FIV (51-53). Quelques auteurs ont rapporté des variations des concentrations de cytokines en cas de patientes ayant une mauvaise réponse à la stimulation en FIV et chez les femmes de plus de 40 ans (53-54). L'objectif de notre étude était donc de comparer les profils cytokiniques intra-folliculaires entre un groupe de femmes ayant une réserve ovarienne diminuée (ROD) et un autre groupe de femmes ayant une réserve ovarienne normale (RON).

### Principaux résultats

Nous avons réalisé une analyse métabolomique ciblée sur 27 cytokines et à partir du FF de 28 femmes atteintes d'une ROD. Nous avons comparé ces profils cytokiniques à ceux obtenus chez 29 femmes ayant une RON (groupe contrôle).

Comme attendu, étant donné qu'une ROD est corrélée à l'âge, l'âge moyen était significativement plus bas dans le groupe RON comparé au groupe ROD ( $p < 0,001$ ).

Sur un total de 27 cytokines dosées dans le FF, 7 n'ont pas été détectées ni dans le groupe RON ni dans le groupe ROD. En utilisant une analyse univariée après transformation logarithmique, les niveaux de 4 cytokines étaient significativement différents dans le groupe ROD comparé au groupe RON. Les

concentrations de PDGF-BB ( $p = 0,005$ ) et de RANTES ( $p = 0,023$ ) étaient significativement inférieures dans le groupe ROD que dans le groupe RON, alors que les concentrations de MCP-1 ( $p = 0,03$ ) et de l'IL-1 *receptor antagonist* (IL-1RA) ( $p = 0,041$ ) étaient significativement plus élevées dans le groupe ROD que dans le groupe RON.

Après correction du risque  $\alpha$ , nous retrouvons seulement une différence concernant les concentrations folliculaires de PDGF-BB qui étaient significativement inférieures dans le groupe ROD ( $7,34 \pm 16,11$  pg/mL) comparé au groupe RON ( $24,39 \pm 41,38$  pg/mL) ( $p=0.004$ ).

Nous ne retrouvons pas de différence significative pour les autres concentrations folliculaires de cytokines. Afin d'évaluer l'influence de l'âge comme potentiel facteur confondant dans la variation de concentration de PDGF-BB entre les 2 groupes, nous avons réalisé une analyse statistique supplémentaire en utilisant le test de Mann-Whitney pour comparer les 15 patientes les plus jeunes du groupe ROD aux 15 patientes les plus âgées du groupe RON. Avec l'analyse univariée, il n'y avait pas de différence retrouvée liée à l'âge des concentrations de PDGF-BB entre les 2 groupes ( $p = 0,25$ ) alors qu'en utilisant le test de Mann-Whitney les concentrations de PDF-BB était significativement plus basses chez les 15 plus jeunes ROD comparé au 15 plus âgées RON ( $p = 0,008$ ).

## **Conclusion**

Notre étude montre donc l'impact du vieillissement ovarien sur le profil cytokinique du FF avec une diminution significative des concentrations de PDGF-BB comparé à un groupe contrôle. Par conséquent, une infertilité liée à une ROD semble être associée à l'altération de voies cytokiniques impliquant le PDGF-BB pouvant potentiellement être à l'origine de perturbations de la folliculogénèse ou des défenses antioxydantes.

Ces résultats ont été présentés sous la forme d'un article accepté avec révisions mineures à *Journal of Obstetrics and Gynecology and Human Reproduction* (IF = 1).

## The cytokine profile of follicular fluid changes during ovarian ageing

Pierre-Emmanuel Bouet, Thomas Boueilh, Juan Manuel Chao de la Barca, Lisa Boucret, Simon Blanchard, Véronique Ferré-L'Hotellier, Pascale Jeannin, Philippe Descamps, Vincent Procaccio, Pascal Reynier, Pascale May-Panloup

### ABSTRACT

*Objective:* Ovarian ageing is one of the commonest causes of infertility in patients consulting for assisted reproductive technology. The composition of the follicular fluid (FF), which reflects the exchanges between the oocyte and its microenvironment, has been extensively investigated to determine the metabolic pathways involved in various ovarian disorders. Considering the importance of cytokines in folliculogenesis, we focused on the cytokine profile of the FF during ovarian ageing.

*Material and methods:* Our cross-sectional study assesses the levels of 27 cytokines and growth factors in the FF of two groups of women undergoing *in vitro* fertilization. One group included 28 patients with ovarian ageing clinically characterized by a diminished ovarian reserve (DOR), and the other group included 29 patients with a normal ovarian reserve (NOR), serving as controls.

*Results:* With univariate analysis, the cytokine profile was found to differ significantly between the two groups. After adjustment of the *p*-values, platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) was the only cytokine with a significantly lower concentration in the DOR group ( $7.34 \pm 16.11$  pg/mL) than in the NOR group ( $24.39 \pm 41.38$  pg/mL) ( $p=0.005$ ), independently of chronological age.

*Conclusion:* Thus, PDGF-BB would seem to be implicated in the physiopathology of DOR, potentially in relation to its role in folliculogenesis or in the protection against oxidative stress.

*Key words:* Follicular fluid, ovarian ageing, diminished ovarian reserve, cytokine profile, platelet-derived growth factor BB.

## Abbreviations

AFC	Antral Follicle Count
AMH	Antimullerian Hormone
ART	Assisted Reproductive Technologies
CCL11	Eotaxin
DOR	Diminished Ovarian Reserve
FF	Follicular Fluid
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GC	Granulosa Cells
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
ICSI	IntraCytoplasmic Sperm Injection
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IVF	In Vitro Fertilization
LH	Luteinizing Hormone
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
NOR	Normal Ovarian Reserve
OCC	Oocyte-Cumulus Complex
PDGF-BB	Platelet-Derived Growth Factor BB
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## Introduction

Ovarian ageing is characterized by the gradual qualitative and quantitative deterioration of the ovarian oocyte reserve, resulting in impaired oocyte competence associated with decreased natural fertility, poor response to ovarian stimulation, and reduced *in vitro* fertilization (IVF) pregnancy rates [1-5].

A diminished ovarian reserve (DOR), the clinical consequence of ovarian ageing, is found in 10% of women enjoying natural maternity compared to 25% of women having recourse to assisted reproductive technology (ART) and being subject to poor fertility outcomes. The assessment and management of women affected by DOR-related infertility is of increasing importance today and a better understanding of the pathophysiological mechanisms of DOR would contribute to improving the implementation of ART [2-4,6].

In the ovarian follicle, the communication between the oocyte and the somatic cells, i.e. the granulosa and cumulus cells, governs the evolution of the follicle from the preantral to the final stage of ovulation. This intrafollicular paracrine dialogue promotes and regulates the specialized microenvironment required to fully support the meiotic and developmental competence of the oocyte, thus ensuring the viability of the embryo [7-11]. This dialogue notably involves cytokines, the small proteins responsible for cell signaling under various physiological or pathological conditions. Cytokines, locally secreted within the ovarian follicle, regulate the ovarian functions, i.e. cell proliferation, steroidogenesis, angiogenesis, and oocyte development [7,12].

The structure of the ovarian follicle evolves during folliculogenesis. From the tertiary stage, the follicle comprises an antrum filled with follicular fluid (FF) surrounding the oocyte-cumulus complex (OCC) [13]. The FF is produced by the transfer of blood plasma components across the blood-follicle barrier, and by the secretions of the oocyte and the ovarian somatic cells, i.e. the theca cells and the granulosa cells (GC). The biochemical and immunological composition of the FF reflect the exchanges contributing to the acquisition of oocyte competence [10,12,14-17]. In the context of IVF, the FF has been explored in the search of biomarkers of oocyte and embryo quality. Various studies have shown some cytokines and growth factors of the FF to be positively correlated with oocyte quality, fertilization rate, embryo development and IVF outcomes, i.e. implantation potential and pregnancy rates [12,18-20]. Studies of the FF should also allow identification of specific markers or pathways underlying certain pathologies. Ageing and DOR are correlated with alterations of GCs and the microenvironment. Some authors have reported variations in the cytokine

concentrations of the FF in poor ovarian responders and in older patients [20-21]. However, to our knowledge, only a few cytokines have been evaluated so far in the context of ovarian ageing. To explore the possible impact of DOR on the cytokine profile of the FF, we performed a targeted quantitative analysis of 27 cytokines in the FF from 28 women with ovarian ageing characterized by DOR, and 29 women with a normal ovarian reserve (NOR) serving as controls.

## Material and methods

### Characteristics of the patients

Fifty-seven women (aged 23-42 years) undergoing *in vitro* fertilization, with or without intracytoplasmic sperm injection (ICSI), were included in this descriptive, cross-sectional, monocentric study, carried out at the Angers University Hospital between November 2015 and March 2016. Patients were enrolled at our ART center, on the morning of oocyte retrieval, and divided into two groups according to the results of tests on their ovarian reserve. Patients were included in the DOR group (28 patients) if they had AMH levels below 2 ng/ml, or an AFC below 5 per ovary. Patients were included in the NOR group (29 patients) with the following criteria: anti-Müllerian hormone (AMH) levels above 2 ng/mL, follicle stimulating hormone (FSH) levels below 8 IU/L, estradiol levels below 60 pg/mL and an antral follicle count (AFC) above 4 per ovary. Except for the AMH assays, all the other dosages and ultrasonography examinations were performed on day-3 of a spontaneous ovarian cycle.

Patients who had only one ovary or a medical history that might have contributed to a DOR, as well as patients with the polycystic ovary syndrome, or endometriosis, were excluded.

The characteristics of the patients and procedures used for the suppression of pituitary gonadotrophin release [using Cetorelix (Cetrotide®; Merck-Serono, Geneva, Switzerland); Ganirelix (Orgalutran®; Organon, Oss, Netherlands); Triptorelin (Decapeptyl®; Ipsen Pharma, Paris, France)], and follicular growth stimulation [using uFSH + uLH (Luteinizing Hormone): Menotropine (Menopur®; Ferring Pharmaceuticals, Copenhagen, Denmark); rFSH and rLH: Follitropine alpha + Lutropine alpha (Pergoveris®; Merck-Serono, Geneva, Switzerland); rFSH: Follitropine alpha (Gonal-f®; Merck-Serono, Geneva, Switzerland) or Follitropine beta (Puregon®; Organon, Oss, Netherlands)] are summarized in [Table I](#). In each case, ovulation was induced with Ovitrelle® (Choriogonadotropine alfa, Merck-Serono, Geneva, Switzerland).



## Collection of follicular fluid

Follicular fluid (FF) was aspirated during vaginal oocyte retrieval under ultrasound guidance 36h after administration of human chorionic gonadotropin. All patients were in the fasting state. Immediately following the ovarian puncture, FF aliquots were examined to detect and remove OCCs, and oocytes were isolated for evaluation and culture. The remaining FF samples, collected from the same patient, were pooled and immediately centrifuged at 800g for 10min to remove residual cells. FF supernatants were collected and stored at -80°C until analysis.

## Quantification of cytokine

The concentrations of 27 cytokines, involved in different cell signaling pathways, i.e. the basic fibroblast growth factor (FGF), eotaxin (CCL11), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon (IFN)  $\gamma$ , the interleukins IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (CXCL8), IL-9, IL-10, IL12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), macrophage inflammatory protein (MIP) 1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4), platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB), RANTES (CCL5), tumor necrosis factor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and the vascular endothelial growth factor (VEGF) A, were determined in the FF by multiplex fluorescent-bead-based technology (Luminex 200™, Austin, TX) using a commercial Luminex screening assay kit (Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Briefly, the FF samples were diluted two-fold before incubation with specific antibody-coated fluorescent beads according to the manufacturer's recommendations. After washing, 50 beads were analyzed with the Luminex 200™ and the cytokine concentrations of the samples were estimated through a serial dilution of cytokine standards.

## Statistical analysis

Univariate statistical analysis of the data of the patients was done using the non-parametric Mann-Whitney test for quantitative variables, and the chi-squared test ( $\chi^2$ ) for qualitative variables. All the calculations were performed with Systat software, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

The statistical analysis of cytokine concentrations was done after log transformation to normalize data. Critical  $p$ -values were calculated using an approach based on the Benjamini-Hochberg procedure [22] to correct the multiple-comparison false-discovery rate.

## Ethical approval

All patients gave their written informed consent, and the collection of samples was approved by the Ethical Committee of the University Hospital of Angers, France (Number CB2015-06).

## Results

### Characteristics of the NOR and DOR patients

The characteristics of the patients are summarized in **Table I**. As expected, since DOR is correlated with ageing, the mean age was significantly lower in the NOR group compared with the DOR group ( $p<0.001$ ). No statistical difference was found in terms of the body mass index (BMI) or addiction to tobacco smoking.

There is no consensus concerning the definition of DOR. The diagnosis is suspected on the basis of a set of arguments (parameters such as AMH, AFC, FSH) varying from team to team and requiring the use of site-specific values (Practice Committee of ASRM, 2015). Our patients were initially classified according to their plasma AMH and FSH levels and to their AFC, thus, the AMH levels ( $p<0.001$ ) and the AFC ( $p<0.001$ ) were significantly lower in the DOR group, whereas the FSH levels were significantly higher than in the NOR group ( $p=0.01$ ). However, plasma E2 and LH baseline levels were not significantly different between the two groups. Moreover, this diagnosis is confirmed by a poor response to stimulation [23]. Thus in our cohort, the ovarian response to the stimulation, in terms of the total amount of gonadotrophin used and according to the number of oocytes retrieved, was lower in the DOR group than in the NOR group. The total dose of FSH used was significantly higher ( $p<0.001$ ) whereas that of the number of oocytes retrieved was significantly lower ( $p<0.001$ ) in the DOR group than in the NOR group. The quantities of the drugs used for the suppression of LH and ovarian stimulation were not significantly different between the two groups (**Table I**).

### Quantification of cytokines in the FF in the NOR and DOR patients

Of the total number of 27 cytokines studied in the FF, 7 were not detected in the DOR and the NOR groups. Using univariate analysis after log transformation, the levels of 4 cytokines were significantly different in the DOR group compared to the NOR group. The concentrations of PDGF-BB ( $p=0.005$ ) and RANTES ( $p=0.023$ ) were significantly lower in the DOR group than in the NOR group, whereas the concentrations of MCP-1 ( $p=0.030$ ) and the IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) ( $p=0.041$ ) were significantly higher in the DOR group than in the NOR group of patients.

After correction of the false discovery rate, only the FF level of PDGF-BB was significantly lower in the DOR group ( $7.34 \pm 16.11$  pg/mL) than in the NOR group ( $24.39 \pm 41.38$  pg/mL) ( $p=0.005$ ) (**Figure 1**).

No statistical differences were found in the FF concentrations of the other cytokines detected (**Table II**).

### **Impact of the chronological age of the NOR and DOR patients**

To examine the possibility of the patient's age being a confounding factor in the variation of the PDGF-BB level between the DOR and the NOR groups of patients, we carried out a supplementary statistical analysis using a Mann-Whitney test to compare the 15 younger DOR patients and the 15 older NOR patients. With univariate analysis, there was no significant age-related difference in the PDGF-BB concentration between the two groups ( $p=0.25$ ), whereas with the Mann-Whitney test, the PDGF-BB level was significantly lower in the 15 younger DOR patients compared to the 15 older NOR patients ( $p=0.0079$ ).

## **Discussion**

Various cytokines play an essential role during folliculogenesis, i.e. in follicular growth and maturation as well as in the ovulation process [7,12,20,24-26]. Since the chemical composition of the FF reflects follicular metabolism during folliculogenesis, the study of cytokine profiles in the FF should help understand the processes underlying follicular physiology and pathology.

Some authors have reported variations in the levels of certain cytokines in the FF in the context of ageing in older women and in poor ovarian responders (POR). In these studies, IL-2, IL-6 and IL-8 levels were found significantly higher whereas the IL-10 level was significantly lower in older women than in younger women and good responders [20,27]. In our study, we assessed the concentrations of a large panel of cytokines ( $n=27$ ) in the FF of NOR and DOR patients. PDGF-BB was the only cytokine with a significantly different concentration in the two groups of patients. Although DOR and POR are two associated conditions, both leading to reduced ovarian responses to stimulation and poor fertility outcomes, no significant differences were found in the IL levels of the FF in the two groups of patients. This result, which is contrary to reports in the literature indicating that IL concentrations are related to ageing, may be due to the relatively small number of patients included in our study.

In addition, in order to control the possible impact of the patient's age as a confounding factor in the difference in the concentration PDGF-BB observed in the two groups of patients, we compared two sub-groups, comprising 15 younger DOR patients and 15 older NOR patients. There was no difference in the mean age of these two groups, whereas the concentration of PDGF-BB was significantly lower in the 15 younger DOR patients compared to the 15 older NOR patients ( $p=0.0079$ ). This result highlights the importance of the ovarian reserve in the decrease of the concentration of PDGF-BB in the FF, regardless of chronological age.

Several authors have discussed the function of PDGF in the FF. Interestingly, this cytokine seems to play a key role during folliculogenesis [28-30]. PDGF, a dimer of disulfide-linked polypeptide chains (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C and PDGF-D), mediates multiple cellular processes such as cell migration and survival, organogenesis and embryogenesis. PDGF paracrine signaling, based on the interaction with two receptor tyrosine kinases, PDGFR- $\alpha$  and PDGFR- $\beta$ , promotes their dimerization [31-32].

In the ovary, PDGF-A chains have been reported in the GCs of secondary follicles whereas PDGF-B chains have been reported in the GCs and theca cells of primary and secondary follicles as well as in oocytes [30,33]. Within the follicle, PDGFs mediate the activation of the primordial follicle and the growth of primary and secondary follicles *via* different pathways. PDGFs promote kit-ligand (KL) secretion by the GCs, leading to the intra-oocyte signalization PI3K (3-phosphoinositide-dependent protein kinase) pathway. Furthermore, PDGFs may directly promote the proliferation of theca cells by their fixation on theca PDGFRs or indirectly *via* the KL fixation [29,30,34,35]. The role of each PDGF isoform during folliculogenesis has not yet been identified. So far, only PDGFR- $\beta$  has been detected in primordial follicles, suggesting the key role of this receptor. In our study, PDGF-BB was the only isoform assessed. Interestingly, *in vivo*, only the PDGF-BB/PDGFR- $\beta$  interaction has been reported. Thus, the decreased concentration of PDGF-BB during ovarian ageing in the DOR patients may be linked to an alteration of the mechanisms involved in follicular activation [31,33]. Moreover, PDGFs promote secondary follicular growth as well, and the decreased concentration of PDGF-BB may have a global impact on folliculogenesis.

PDGF-BB may also act as an important antioxidative signaling factor as reported in neural tissues. The protective role of PDGF-BB has been evidenced in astrocytes in which oxidative damage is attenuated by the decreased formation of reactive oxygen species [36]. Ovarian ageing and DOR are associated with increased oxidative stress in the follicular

environment. Indeed, several authors have reported variations of oxidative markers in the FF of older women and poor ovarian responders [27,37,38]. Thus, we may hypothesize that the decreased concentration of PDGF-BB in patients with DOR may be linked to increased oxidative stress.

In conclusion, our study shows the impact of ovarian ageing on the cytokine profile of the FF with a decreased level of PDGF-BB compared to control patients. Thus, DOR-related infertility may be linked to the alteration of metabolic pathways involving PDGF-BB, leading to the perturbation of folliculogenesis or antioxidative defenses.

### **Key message**

PDGF-BB would seem to be implicated in the physiopathology of diminished ovarian reserve.

### **Acknowledgements**

We are grateful to Kanaya Malkani for his critical reading and comments on the manuscript.

### **Funding**

This study was supported by the University Hospital of Angers, and the University of Angers, France without specific funding. There were no competing interests.

### **Conflict of interest**

The authors declare no conflicts of interest.



**Table I** Characteristics of the patients

Covariates	Overall (n=57)	NOR (n=29)	DOR (n=28)	P-value
<b>Age of patients (years)</b> Mean (SD)	33.16 (5.19)	29.76 (4.16)	36.68 (3.58)	< 0.001* Mann-Whitney
<b>Body mass index</b> Mean (SD)	23.56 (5.15)	23.17 (5.48)	23.97 (4.84)	0.40 Mann-Whitney
<b>Addiction to smoking</b>				
Non-smoker (n)	36	17	19	0.342
Smoker (n)	18	10	8	Khi-deux
Former smoker (n)	2	2	0	
Information missing (n)	1	0	1	
<b>E2 baseline (pg/mL)</b> Mean (SD)	40.51 (20.35)	41.54 (16.62)	39.44 (23.88)	0.380 Mann-Whitney
<b>FSH baseline (UI/L)</b> Mean (SD)	8.07 (2.97)	7.07 (1.99)	9.11 (3.47)	0.01* Mann-Whitney
<b>LH baseline (UI/L)</b> Mean (SD)	5.05 (2.26)	4.62 (1.96)	5.53 (2.49)	0.186 Mann-Whitney
<b>AMH baseline (ng/mL)</b> Mean (SD)	2.38 (1.70)	3.73 (1.23)	0.94 (0.56)	< 0.001* Mann-Whitney
<b>Antral follicle count</b> Mean (SD)	14.26 (7.56)	19.74 (6.57)	8.58 (2.82)	< 0.001* Mann-Whitney
<b>Total dose of FSH (UI)</b> Mean (SD)	2605 (1165)	1746 (548)	3496 (942)	< 0.001* Mann-Whitney
<b>LH suppression</b>				
Agonist	3	2	1	0.57
Antagonist	54	27	27	Khi-deux
<b>Stimulation</b>				
FSH	46	25	21	0.28
FSH+LH	11	4	7	Khi-deux
<b>Number of retrieved OCCs</b> Mean (SD)	8.67 (6.22)	11.72 (6.80)	5.30 (3.46)	< 0.001* Mann-Whitney

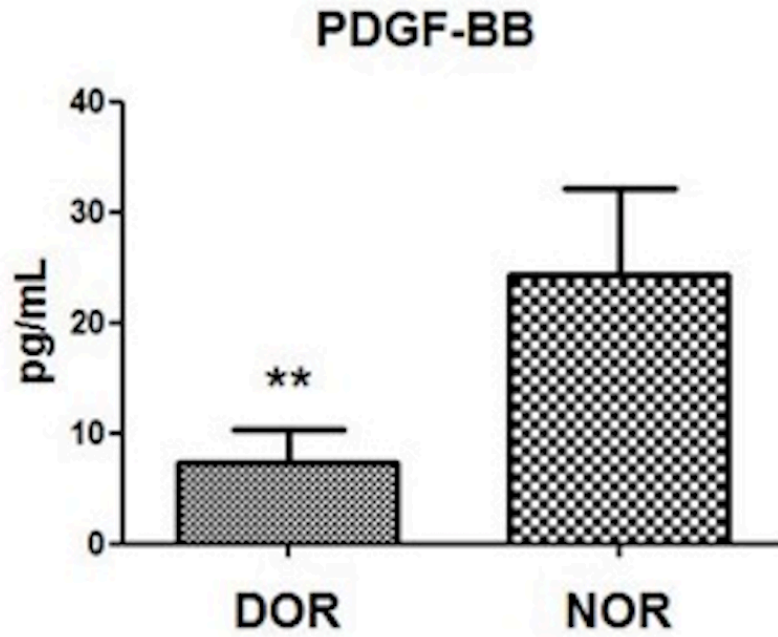
**Table II** Concentrations of 23 cytokines showing no significant difference between patients with a normal ovarian reserve and patients with a diminished ovarian reserve.

Cytokines	NOR (n=29)	Valeur-P <sup>a</sup>	DOR (n=28)
FGF	60.92 (0-151.84)	0.23 (NS)	
Eotaxine	10.86 (0-50.75)	0.21 (NS)	66.11 (25.07-130.09)
G-CSF	0 (0) <sup>b</sup>	1 (NS)	16,65 (0-116.91)

GM-CSF	218.23 (0-347.93)	0.95 (NS)	0 (0) <sup>b</sup>
IFN- $\gamma$	41.98 (0-354.97)	0.65 (NS)	202.39 (30.48-345.97)
IL-1 $\beta$	0 (0) <sup>b</sup>	1 (NS)	30.17 (0-162.23)
IL-2	0 (0) <sup>b</sup>	1 (NS)	0 (0) <sup>b</sup>
IL-4	1.88 (0-6.58)	0.08 (NS)	0 (0) <sup>b</sup>
IL-5	0 (0) <sup>b</sup>	1 (NS)	0.97 (0-4.91)
IL-6	3.16 (0-81.61)	0.85 (NS)	0 (0) <sup>b</sup>
IL-7	5.95 (0-36.19)	0.25 (NS)	4.25 (0-86.98)
IL-8	184.55 (50.96-384.37)	0.16 (NS)	7.90 (0-21.3)
IL-9	9.80 (0-48.37)	0.91 (NS)	267.30 (55-49-1885.99)
IL-10	1.72 (0-26.91)	0.94 (NS)	10.09 (0-39.8)
IL-12 (p70)	105.13 (0-244.41)	0.26 (NS)	1.23 (0-17.44)
IL-13	3.45 (0-14.92)	0.83 (NS)	135,06 (0-248.67)
IL-15	0 (0) <sup>b</sup>	1 (NS)	3.08 (0-11.23)
IL-17A	0 (0) <sup>b</sup>	1 (NS)	0 (0) <sup>b</sup>
IP-10	222.13 (87.25-712.26)	0.21 (NS)	0 (0) <sup>b</sup>
MIP-1 $\alpha$	0.95 (5.83)	0.43 (NS)	291.56 (78.51-988.7)
MIP-1 $\beta$	46.57 (17.1-88.34)	0.57 (NS)	1.13 (0-2.76)
TNF $\alpha$	0 (0) <sup>b</sup>	1 (NS)	47.44 (3.79-105.73)
VEGF-A	1181.24 (456.53-2594.75)	0.16 (NS)	0 (0) <sup>b</sup>
			1434,00 (174.39-2779.82)

NOR: normal ovarian reserve; DOR: diminished ovarian reserve; FGF: fibroblast growing factor; G-CSG: granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN: interferon; IL: interleukin; MIP: macrophage inflammatory protein; TNF: tumor necrosis factor; VEGF: vascular endothelial growth factor; NS: not significant. <sup>a</sup>Level of significance is defined as  $P < 0.05$ . <sup>b</sup>Undetectable value. Data are median (pg/mL).

**Figure 1** Cytokines concentrations of platelet-derived growth factor (PDGF)-BB (pg/mL) in follicular fluid from diminished ovarian reserve (DOR) and normal ovarian reserve (NOR) patients. Data represent mean  $\pm$  SEM. PDGF-BB: \*\* P=0.004 lower level in DOR patients compared with control.



## References

- [1] Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong, FH, Habbema JD, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002;77:328–336.
- [2] Broekmans FJ Soules, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev* 2009;30:465-93.
- [3] Cohen J, Chabbert-Buffet N, Darai, E. Diminished ovarian reserve, premature ovarian failure, poor ovarian responder – a plea for universal definitions. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:1709-12.
- [4] Devine K, Mumford SL, Wu M, DeCherney AH, Hill MJ, Propst A. Diminished ovarian reserve in the United States assisted reproductive technology population: diagnostic trends among 181,536 cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System. *Fertil Steril* 2015; 104:612–619.e3.
- [5] Nelson SM, Telfer EE, Anderson RA. The ageing ovary and uterus: new biological insights. *Hum Reprod Update* 2013;19:67-83.
- [6] Eijkemans MJ, van Poppel F, Habbema DF, Smith K., Leridon H, te Velde ER. Too old to have children? Lessons from natural fertility populations. *Hum Reprod* 2014;29:1304-12.
- [7] Baskind NE, Orsi NM, Sharma V. Follicular-phase ovarian follicular fluid and plasma cytokine profiling of natural cycle in vitro fertilization patients. *Fertil Steril* 2014;102:410-8.
- [8] Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril* 2015;103:303-16.
- [9] Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 2008;14:159-77.
- [10] Pacella L, Zander-Fox DL, Armstrong DT, Lane M. Women with reduced ovarian reserve or advanced maternal age have an altered follicular environment. *Fertil Steril* 2012;98:986-94.e1-2.
- [11] Tatone C, Amicarelli F, Carbone MC, Monteleone P, Caserta D, Marci R, et al. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum Reprod Update* 2008;14:131-42.
- [12] Vujisic S, Zidovec S. Follicular immunology environment and the influence on in vitro fertilization outcome. *Current Women's Health Reviews* 2005;1:49-60.
- [13] Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994; 50:225–232.
- [14] McRae C, Sharma V, Fisher J. Metabolite profiling in the pursuit of biomarkers for IVF outcome: The case for metabolomics studies. *Int J Reprod Med.* 2013;2013:603167.
- [15] O’Gorman A, Wallace M, Cottell E, Gibney MJ, McAuliffe FM, Wingfield M, et al. Metabolic profiling of human follicular fluid identifies potential biomarkers of oocyte developmental competence. *Reproduction* 2013;146:389–395.
- [16] Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:40.

- [17] Wallace M, Cottell E, Gibney MJ, McAuliffe FM, Wingfield M, Brennan L. An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. *Fertil Steril* 2012;97:1078-84-8.
- [18] Bedaiwy M, Shahin AY, AbulHassan AM, Goldberg JM, Sharma RK, Agarwal A, et al. Differential expression of follicular fluid cytokines: relationship to subsequent pregnancy in IVF cycles. *Reprod Biomed Online* 2007;15:321-5.
- [19] Lédée N, Lombroso R, Lombardelli L, Selva J, Dubanchet S, Chaouat G, et al. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Hum Reprod* 2008;23:2001-9.
- [20] Taghavi SA, Ashrafi M, Mehdizadeh M, Karimian L, Joghataie MT, Aflatoonian R. Toll-like receptors expression in follicular cells of patients with poor ovarian response. *Int J Fertil Steril* 2014;8:183-92.
- [21] Karaer A, Tuncay G, Mumcu A, Dogan B. Metabolomics analysis of follicular fluid in women with ovarian endometriosis undergoing in vitro fertilization. *Syst Biol Reprod Med* 2019;65:39-47.
- [22] Tan YD, Xu H. A general method for accurate estimation of false discovery rates in identification of differentially expressed genes. *Bioinformatics* 2014 ;30: 2018-2025.
- [23] Practice Committee of the American Society for Reproductive. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril* 2015;103:e9-e17.
- [24] Caillaud M, Duchamp G, Gérard N. In vivo effect of interleukin-1beta and interleukin-1RA on oocyte cytoplasmic maturation, ovulation, and early embryonic development in the mare. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:26.
- [25] Kol S, Donesky BW, Ruutiainen-Altman K, Ben-Shlomo I, Irahara M, Ando M, et al. Ovarian interleukin-1 receptor antagonist in rats: gene expression, cellular localization, cyclic variation, and hormonal regulation of a potential determinant of Interleukin-1 action. *Biol Reprod* 1999;6;274-282.
- [26] Xu H, Schultze-Mosgau A, Agic A, Diedrich K, Taylor RN, Hornung D. Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and monocyte chemotactic protein 1 in follicular fluid accumulate differentially in patients with and without endometriosis undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006;86: 1616-20.
- [27] Nuñez-Calonge R, Cortés S, Gutierrez Gonzalez LM, Kireev R, Vara E, Ortega L, et al. Oxidative stress in follicular fluid of young women with low response compared with fertile oocyte donors. *Reprod Biomed Online* 2016;32:446–456.
- [28] Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Comparison between cytokine concentration in follicular fluid of poor and high responder patients and their influence of ICSI-outcome. *Am J Reprod Immunol* 2003;50:131-6.
- [29] Scotti L, Parborell F, Irusta G, De Zuñiga I, Bisioli C, Pettorossi H, et al. Platelet-derived growth factor BB and DD and angiopoietin1 are altered in follicular fluid from polycystic ovary syndrome patients. *Mol Reprod Dev* 2014;81:748-56.



- [30] Sleer LS, Taylor CC. Cell-type localization of platelet-derived growth factors and receptors in the postnatal rat ovary and follicle. *Biol Reprod* 2007;76:379-90.
- [31] Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 2008;22:1276-312.
- [32] Pascuali N, Scotti L, Abramovich D, Irusta G, Di Pietro M, Bas D, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor affects follicular development and ovarian proliferation, apoptosis and angiogenesis in prepubertal eCG-treated rats. *Mol Cell Endocrinol* 2015;412:148-58.
- [33] Pinkas H, Fisch B, Rozansky G, Felz C, Kessler-Icekson G, Krissi H, et al. Platelet-derived growth factors (PDGF-A and -B) and their receptors in human fetal and adult ovaries. *Mol Hum Reprod* 2008;14:199-206.
- [34] Gougeon A. Régulation de l'initiation de la croissance folliculaire. *Gynecol Obstet Fertil* 2011;39:511-513.
- [35] Hasegawa A, Kumamoto K, Mochid, N, Komori S, Koyama K. Gene expression profile during ovarian folliculogenesis. *J Reprod Immunol* 2009;83:40-4.
- [36] Cabezas R, Vega-Vela NE, González-Sanmiguel J, González J, Esquinas P, Echeverria V, et al. PDGF-BB preserves mitochondrial morphology attenuates ROS production and upregulates neuroglobin in an astrocytic model under rotenone insult. *Mol Neurobiol* 2018;55:3085-95.
- [37] Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R, et al. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod* 2003;9:639-643.
- [38] Elizur SE, Lebovitz O, Orvieto R, Dor J, Zan-Bar T. Reactive oxygen species in follicular fluid may serve as biochemical markers to determine ovarian aging and follicular metabolic age. *Gynecol Endocrinol* 2014;30:705-707.

# Perspectives : recherche par métabolomique de biomarqueurs endométriaux dans les fausses-couches spontanées à répétition et les échecs d'implantation répétés après FIV, projet ENDOMETAB

## 1. Contexte et justification de la recherche

### 1.1. Etat actuel des connaissances

L'implantation embryonnaire est un processus complexe au cours duquel l'embryon humain s'appose d'abord à l'endomètre maternel, y adhère puis finalement y pénètre et l'envahit. Alors que l'implantation peut se produire dans n'importe quel tissu du corps humain, l'endomètre est pratiquement le seul tissu dans lequel l'embryon ne peut pas s'implanter excepté pendant une période très limitée appelée fenêtre implantatoire.

Au cours de cette période, il offre une réceptivité maximale à l'embryon. L'existence d'une fenêtre d'implantation est requise pour l'établissement d'un dialogue paracrine complexe entre la mère et l'embryon. Chez la femme, on pense que cette période dure à peu près 4 jours et survient 5 à 9 jours après l'ovulation.

Récemment, plusieurs études réalisées sur fluide utérin chez l'animal, ont permis de démontrer le rôle des lipides dans la réceptivité endométriale et l'implantation embryonnaire (55). En effet, plusieurs médiateurs de l'implantation ont été retrouvés comme les endocannabinoïdes, l'acide lysophosphatidique et les prostaglandines (PGs). Différentes études ont été faites pour évaluer l'impact des PGs (métabolites de l'acide arachidonique) sur l'implantation et notamment pour déterminer des variations de concentration de ces molécules au cours du cycle menstruel. Plusieurs modèles animaux et types de PGs (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$  et PGI<sub>2</sub>) ont été étudiés (souris, rat, hamster, lapin, porc) et ont permis de constater des variations de concentrations des différentes PGs dans le fluide utérin au cours du cycle menstruel (55). Par exemple, il était retrouvé chez la souris et le rat une augmentation de la PGE<sub>2</sub> et de la PGI<sub>2</sub> durant la fenêtre d'implantation. Chez le lapin, il était plutôt constaté une augmentation de la PGE<sub>2</sub> et de la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  durant cette même période du cycle.

Malgré ces constatations mettant en avant le rôle des métabolites tels que les PGs sur l'implantation, très peu d'études ont été réalisées chez l'humain afin de confirmer ou d'infirmer ces données.

En mai 2017, une Cochrane a été publiée concernant l'utilisation de l'approche métabolomique en AMP (56). Quatre études ont été incluses et concernaient toutes l'évaluation métabolomique des embryons. Les auteurs de la Cochrane signalaient qu'ils n'avaient retrouvé aucune étude s'étant intéressé au profil métabolique de l'endomètre. Ils concluaient qu'il serait nécessaire de mettre en place des études évaluant le profil métabolique de l'endomètre en AMP et notamment chez des femmes aux antécédents d'échecs d'implantation répétés. Ces études permettraient de savoir s'il existe des biomarqueurs endométriaux dans ce type de pathologies et, si c'est le cas, cela ouvrirait potentiellement le champ à de nouvelles voies thérapeutiques.

En pratique, des anomalies d'implantation embryonnaire sont constatées dans 2 types de situation : les échecs d'implantation répétés (EIR) après fécondation in vitro (FIV) et les fausses couches spontanées à répétition dites « idiopathiques » (FCSR-I).

Il n'existe aucun consensus international pour définir les EIR post-FIV. L'une des définitions la plus couramment utilisée est celle issue de la revue de la littérature récente réalisée par Coughlan et al (14). Les auteurs définissaient les EIR comme l'échec de l'obtention d'une grossesse clinique (activité cardiaque constatée à l'échographie de datation vers 6-7 semaines d'aménorrhée) après au moins 3 transferts différents comportant au total au moins 4 embryons de bonne qualité (frais ou congelés) chez des femmes de moins de 40 ans.

Les fausses-couches spontanées à répétition (FCSR) sont définies par les sociétés savantes européenne, britannique et française (16-18) comme un antécédent de 3 FCS consécutives étant survenues avant 14 semaines d'aménorrhée et pouvant inclure des fausses-couches non visualisées à l'échographie. Les FCSR touchent environ 2 à 5% des couples ayant un désir de grossesse (18,19).

En 2010, une équipe israélienne a publié une étude cas-contrôle comparant 19 femmes aux antécédents d'échecs d'implantation répétés (EIR) après fécondation in vitro (FIV) (groupe « cas ») à 15 femmes ayant

une fertilité prouvée (antécédent d'au moins un accouchement) (groupe « contrôle »). Un prélèvement d'endomètre était fait vers le jour 21-24 du cycle pour le groupe « cas » et vers le jour 10 du cycle pour le groupe « contrôle ». Il était alors constaté entre les deux groupes une différence significative des concentrations endométriales des enzymes intervenant dans la synthèse des PG (CPLA2 $\alpha$ , COX2, SPLA2-IIA, LPA3). Il existerait donc une anomalie de synthèse des PG chez l'humain au moment de l'implantation chez les patientes atteintes d'EIR entraînant alors une diminution de la réceptivité endométriale (57).

Une étude espagnole s'est aussi intéressée à l'influence des lipides (et notamment des PG) sur l'implantation embryonnaire (55). Les auteurs ont analysé le fluide endométrial de 51 patientes âgées de 18 à 35 ans et ayant des cycles menstruels réguliers. Les autres critères d'inclusion étaient : caryotype normal, indice de masse corporelle entre 19 et 29 kg/m<sup>2</sup>, bon état de santé général. Ces 51 échantillons ont été divisés en 5 groupes en fonction du moment du cycle durant lequel ils ont été réalisés (J1 correspondant au 1er jour des règles) : groupe 1 (J1-J8 du cycle, n = 10), groupe 2 (J9-J14 du cycle, n = 15), groupe 3 (J15-J18 du cycle, n = 9), groupe 4 (J19-J23 du cycle, n = 9) et groupe 5 (J24-J30, n = 8). Neuf lipides étaient analysés dans le fluide utérin : N-arachidonoyl éthanolamine, N-palmitoyl éthanolamine, N-oléoyl éthanolamine, 2-arachidonoyl glycérol, N-stéaroyl éthanolamine, N-linoléoyl-éthanolamine, PGF1 $\alpha$ , PGE 2 et PGF2 $\alpha$ .

Les auteurs constataient une augmentation significative des concentrations de PGE2 et de PGF2 $\alpha$  durant la fenêtre d'implantation (groupe 4) par rapport aux autres périodes du cycle et plus particulièrement vers le J19-J21 du cycle.

Par ailleurs, il a aussi été démontré, qu'après l'ovulation, l'utérus se relaxe progressivement jusqu'au milieu de la phase lutéale, phénomène vraisemblablement destiné à assister le positionnement adéquat de l'embryon dans la cavité utérine et à faciliter l'implantation embryonnaire (58). En effet, Fanchin et al ont étudié la contractilité utérine par échographie 3-dimension (3D) et en time-mode (TM) chez 43 femmes stimulées en FIV (59). Toutes les femmes avaient été stimulées par un protocole long. La fréquence des contractions utérines a été calculée le jour du déclenchement de l'ovulation puis 4 jours après (jour du transfert d'embryon) puis 7 jours après (jour correspondant à la fenêtre d'implantation). Il était alors constaté

une diminution significative de la fréquence des contractions utérines qui passait de 4.4 par minute au moment du déclenchement à 1.5 lors de l'implantation ( $p < 0.05$ ) (59).

Différents facteurs peuvent agir sur la contractilité utérine à cette période du cycle :

- La progestérone a un effet myorelaxant et est d'ailleurs couramment utilisé afin d'obtenir un bon relâchement utérin avant un transfert embryonnaire (59).
- Les PG sont connues pour avoir une activité utérotonique en entraînant une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des contractions utérine (60). Une PG (misoprostol) est d'ailleurs utilisée en pratique clinique afin de provoquer l'expulsion d'un sac gestationnel en cas de fausse couche prématuré (œuf clair, grossesse arrêtée). Une autre PG (sulprostone) joue un rôle important dans le traitement des atonies utérines à l'origine d'hémorragie du post-partum.

D'après les études d'Achache (57) et de Villela (55) précédemment décrites, il existerait une perturbation de la synthèse des PG au moment de la fenêtre d'implantation chez des femmes aux antécédents d'EIR. Cette anomalie de synthèse des PG pourrait alors influencer la contractilité utérine et les chances d'implantation d'un embryon.

Une équipe indienne s'est aussi récemment intéressée au profil métabolique de patientes ayant un antécédent de FCSR-I ou d'EIR après FIV (61,62).

Leur 1ère étude publiée en 2014 incluait 31 femmes de moins de 35 ans ayant un antécédent d'au moins 3 FCSR-I consécutives (61). Le groupe contrôle comprenait 28 femmes ayant déjà eu plusieurs enfants et sans antécédents de FCSR. Un prélèvement sanguin veineux était réalisé chez toutes ces femmes entre le 18ème et le 22ème jour de leur cycle au moment supposé de la fenêtre d'implantation et après avoir confirmé l'ovulation quelques jours plus tôt. Grâce à une spectroscopie par résonance magnétique nucléaire à haute résolution, un profil métabolique sérique a pu être obtenu pour chaque patiente. Après analyse statistique multivariée, les auteurs retrouvaient une différence marquée significative entre le groupe FCSR-I et le groupe contrôle. Ils constataient l'augmentation significative des concentrations de sept acides aminés dans

le groupe FCSR-I (L-lysine, L-arginine, L-glutamine, L-histidine, L-thréonine, L-phénylalanine et L-tyrosine) (61).

Leur 2ème étude publiée en 2016 incluait 28 femmes de moins de 41 ans aux antécédents d'EIR (au moins 3 échecs consécutifs de FIV au cours desquelles 2 à 3 embryons de bonne qualité étaient transférés à chaque tentative) (62). Le groupe contrôle était constitué de femmes ayant eu une implantation embryonnaire à chaque tentative de FIV. Les auteurs inventent alors le terme de « succès d'implantation répétés » pour ces patientes à haut potentiel de réceptivité.

Les stimulations ovariennes en vue d'une FIV étaient réalisées à l'aide de protocole long à des doses de gonadotrophines variant entre 150 et 300 UI. Une échographie était faite par voie transvaginale au jour 10 de la stimulation. Un déclenchement de l'ovulation par HCG 10000 UI avait lieu en intramusculaire lorsqu'au moins 2 follicules avaient un diamètre  $\geq$  à 18 mm. Une ponction ovocytaire était alors programmée 34 h après le déclenchement. En moyenne, 3 embryons étaient transférés 3 à 5 jours après la ponction. Un support de la phase lutéale était systématiquement réalisé par progestérone micronisée jusqu'au test de grossesse puis prolongé en cas de test positif jusqu'à 12 semaines d'aménorrhée (SA).

Dans les 2 groupes, un prélèvement sanguin était fait par voie veineuse au moment de la fenêtre d'implantation, c'est-à-dire 7 à 10 jours après le pic ovulatoire.

Après spectroscopie par RMN et analyse statistique multivariée, les auteurs constataient qu'il existait des concentrations significativement plus élevées de 8 métabolites dans le groupe EIR : valine, acide adipique, L-lysine, créatine, ornithine, glycérol et D-glucose. Ils notaient, par ailleurs, des taux sériques de la NO synthase endothéliale (eNOS) significativement plus bas dans le groupe EIR (62).

L'approche métabolomique permettrait donc d'identifier des biomarqueurs pertinents et fiables de l'implantation embryonnaire issus de moyens d'investigation non invasifs et applicables en pratique quotidienne.

Cependant aucune étude ne s'est intéressée à un profil métabolique sur prélèvement de cellules endométriales afin d'identifier des biomarqueurs d'EIR ou de FCSR-I. En effet, RoyChoudhury et al (62)



précisaient d'ailleurs que la principale limite de leur étude reposait dans le fait qu'ils n'avaient pas fait d'évaluation métabolomique sur cellules endométriales. Ils extrapolaient sur le fait que les différents profils de métabolites qu'ils constataient sur prélèvement sanguin pourraient être retrouvés dans le tissu endométrial et alors expliquer les EIR. Vilella et al (55) ne s'intéressaient, quant à eux, qu'au fluide endométrial et non à l'endomètre lui-même. La seule équipe à avoir analysé des tissus endométriaux était l'équipe d'Achache et al (57) mais ils ne se sont intéressés qu'aux enzymes responsables de la synthèse des PG.

Il nous a donc semblé intéressant de déterminer les profils métaboliques endométriaux de patientes ayant des antécédents de FCSR-I ou d'EIR et de les comparer à une population contrôle de patientes « fertiles » afin de savoir s'il existe des empreintes métaboliques différentes en cas de FCSR-I ou d'EIR au sein même de l'endomètre au moment de la fenêtre d'implantation.

## 1.2. Hypothèses de la recherche

Les hypothèses de la recherche sont :

- Profil métabolique endométrial différent en cas d'EIR par rapport à une population contrôle sans antécédent d'EIR.
- Profil métabolique endométrial différent en cas de FCSR-I par rapport à une population contrôle sans antécédent de FCSR-I.
- Profils métaboliques différents entre les 2 types de prélèvement (sériques, et endométriaux) pour chaque groupe et entre les 2 groupes (FCSR-I et EIR).
- Profils métaboliques différents en fonction des étiologies d'infertilité parmi les patientes du groupe étude.

## 2. Objectifs de la recherche et critères d'évaluation

### 2.1. Objectif et critère d'évaluation principal

Comparer le profil métabolique endométrial chez des patientes aux antécédents d'EIR après FIV par rapport à des patientes prises en charge en AMP et dont l'infertilité est liée à une origine masculine.

Comparer le profil métabolique endométrial chez des patientes aux antécédents de FCSR-I par rapport à des patientes prises en charge en AMP et dont l'infertilité est liée à une origine masculine.

Les critères d'évaluation principaux reposeront sur l'identification des métabolites endométriaux après analyse par spectrométrie de masse et modélisation statistique.

### 2.2. Objectifs et critères d'évaluation secondaires

Comparer les profils métaboliques entre les 2 types de prélèvement (sériques et endométriaux) pour chaque groupe et entre les 2 groupes (FCSR-I et EIR).

En cas de signatures métaboliques identifiées, étudier la nature de ces signatures et identifier les mécanismes pouvant en être responsables.

Evaluer le profil métabolique endométrial en fonction de l'étiologie de l'infertilité pour les patientes du groupe étude (endométriose, insuffisance ovarienne, syndrome des ovaires polykystiques ...).

Les critères d'évaluation secondaires reposeront sur l'identification des métabolites endométriaux et sériques. Ces différents profils seront aussi analysés en fonction des étiologies d'infertilité dans le groupe étude.

## 3. Conception de la recherche

### 3.1. Schéma de la recherche

Il s'agit d'une étude cas/témoins historico-prospective qui a pour objet de comparer les profils métaboliques endométriaux de 3 groupes.

Les deux groupes cas ont déjà été constitués et les échantillons collectés dans le cadre d'un projet de recherche de biocollection existant intitulé « Collection Fertilité », c'est pourquoi la cohorte de cas est considérée comme « historique ».

Un premier groupe « cas » est constitué de patientes ayant un antécédent d'EIR défini comme l'échec de l'obtention d'une grossesse clinique (activité cardiaque constatée à l'échographie de datation vers 6-7 semaines d'aménorrhée) après au moins 3 transferts différents comportant au total au moins 4 embryons de bonne qualité (frais ou congelés).

Un deuxième groupe « cas » est constitué de patientes ayant un antécédent de FCSR-I défini comme un antécédent de 3 FCS consécutives étant survenues avant 14 semaines d'aménorrhée et pouvant inclure des fausses-couches non visualisées à l'échographie.

En cas d'EIR ou de FCSR-I, nous réalisons de manière systématique un prélèvement d'endomètre afin de rechercher la présence de plasmocytes, témoins d'une endométrite chronique pouvant favoriser les EIR ou les FCSR (63). Le projet de biocollection « Fertilité » auquel les patientes « cas » ont accepté de participer (signature du formulaire de consentement pour la collection) consiste à mettre en collection les déchets ou reliquats des échantillons réalisés dans le cadre du soin (sang, endomètre,...). Des prélèvements sanguins supplémentaires sont également réalisés dans le cadre de cette biocollection. L'objectif de cette biocollection « fertilité » est de permettre d'améliorer les connaissances scientifiques autour des problèmes de fertilité. A partir des échantillons collectés (ovocytes immatures, cellules folliculeuses, liquide folliculaire, tissu ovarien ou endométrial), plusieurs études ont déjà été menées portant sur divers facteurs biologiques y compris génétiques. La cohorte ainsi constituée comporte également le recueil des données du dossier médical dont l'interprétation pourra changer en fonction de l'évolution des connaissances médicales.

Pour les patientes « cas », aucun prélèvement n'est réalisé spécifiquement pour la recherche étant donné que le prélèvement d'endomètre et la prise de sang sont systématiquement faits en cas de bilan d'EIR.

Pour les patientes « témoins », le prélèvement d'endomètre et le prélèvement sanguin seront réalisés spécifiquement pour la recherche.

Cette biocollection a été déclarée (DC-2014-2224). L'objectif de cette cohorte « Fertilité » et de la collection biologique associée est de permettre d'améliorer les connaissances scientifiques autour des problèmes de fertilité.

Puisque nous souhaitons comparer les profils métaboliques endométriaux de patientes atteintes d'EIR ou de FCSR-I à une population témoin, nous devons réaliser un prélèvement d'endomètre chez des patientes n'ayant pas d'antécédent d'EIR ou de FCSR.

Ce protocole de RIPH concerne donc le groupe témoin constitué de patientes prises en charge en AMP et dont l'infertilité est liée à une origine masculine (oligoasthénospermie sévère ou azoospermie chez le conjoint, pas d'altération de la réserve ovarienne ni d'antécédent particulier pouvant être à l'origine d'une infertilité chez la patiente). En effet, nous souhaitons comparer notre population de patientes atteintes d'EIR ou de FCSR-I à une population contrôlée considérée comme « fertile » et dont l'origine de l'infertilité est donc liée à une étiologie masculine.

### **3.2. Justification du nombre de personnes à inclure dans la recherche**

Quatre-vingt patientes correspondant aux critères de sélection de l'étude ont déjà été incluses dans le projet de « Collection Fertilité » respectivement dans chacun des deux groupes « cas » (40 patientes atteintes d'EIR et 40 patientes atteintes de FCSR-I).

Il est prévu d'inclure 40 patientes témoins dans cette recherche.

## **4. Sélection des personnes de la recherche**

### **4.1. Critères de sélection des patientes dans les groupes « cas » (déjà incluses dans la « collection fertilité »)**

#### **4.1.1. Critères d'inclusion pour les cas**

Pour l'ensemble des cas :

- Age  $\geq$  18 ans et  $<$  40 ans.
- Patientes incluses dans la « Collection Fertilité » (signature du formulaire de consentement pour la collection) et pour lesquelles des échantillons d'endomètre et de sang sont disponibles.

#### Pour le sous-groupe EIR :

- Antécédents d'EIR définis comme l'échec de l'obtention d'une grossesse clinique (activité cardiaque constatée à l'échographie de datation vers 6-7 semaines d'aménorrhée) après au moins 3 transferts différents comportant au total au moins 4 embryons de bonne qualité (frais ou congelés). Un embryon de bonne qualité se définit au jour 2 ou 3 comme ayant une bonne cinétique de croissance, des cellules régulières et peu de fragments (< 30%). Un embryon de bonne qualité se définit au jour 5 comme ayant un bouton embryonnaire et un trophoctoderme satisfaisant.

#### Pour le sous-groupe FCSR-I :

- Antécédents de FCSR définis comme un antécédent de 3 FCS consécutives étant survenues avant 14 semaines d'aménorrhée et pouvant inclure des fausses-couches non visualisées à l'échographie.

#### **4.1.2. Critères de non-inclusion pour les cas**

- Bilan retrouvant une origine autre qu'endométriale aux antécédents d'infertilité. Ce bilan comprend (64):
  - Les caryotypes de la patiente et de son conjoint.
  - Une glycémie à jeun et des dosages sanguins de TSH, prolactine et vitamines B9 et B12.
  - Un bilan immunologique et thrombophilique : recherche d'anticoagulant circulant de type lupique, d'anticorps anti-cardiolipines, d'anticorps antiβ2glycoprotein, d'anticorps antiTPO, d'anticorps antithyroglobulines, d'une homocystéinémie.
  - Une hystérosonographie ou hystérosalpingographie.
- Mauvaise compréhension de la langue française.
- Majeures protégées par la loi :
  - Personnes privées de liberté par décision judiciaire ou administrative
  - Personnes faisant l'objet de soins psychiatriques
  - Personnes faisant l'objet d'une mesure de protection légale

- Personnes hors d'état d'exprimer leur consentement

- Patientes non affiliées ou non bénéficiaires d'un régime de sécurité sociale.

- Patientes en cours de participation à une recherche interventionnelle.

## **4.2. Critères de sélection des personnes qui se prêtent à la recherche (groupe « témoin »)**

### **4.2.1. Critères d'inclusion pour les témoins**

- Age  $\geq$  18 ans et  $<$  40 ans.

- Patientes prises en charge en AMP et dont l'infertilité est liée à une origine masculine, c'est-à-dire dont le conjoint est porteur d'une oligoasthénospermie sévère ou d'une azoospermie.

- Patientes n'ayant pas d'antécédent particulier pouvant être à l'origine d'une infertilité.

- Patientes dont les examens complémentaires avant la prise en charge en AMP sont normaux : sont pris en compte le bilan hormonal (FSH, LH, œstradiol et AMH), le compte de follicules antraux et l'hystérosonographie (ou l'hystérosalpingographie).

- Patientes ayant signé un consentement éclairé pour participer à l'étude.

### **4.2.2. Critères de non-inclusion pour les témoins**

- Mauvaise compréhension de la langue française.

- Majeures protégées par la loi :

- Personnes privées de liberté par décision judiciaire ou administrative
- Personnes faisant l'objet de soins psychiatriques
- Personnes faisant l'objet d'une mesure de protection légale
- Personnes hors d'état d'exprimer leur consentement

- Patientes non affiliées ou non bénéficiaires d'un régime de sécurité sociale.

- Patientes en cours de participation à une autre recherche interventionnelle.



## 5. Prise en charge et traitements administrés aux personnes qui se prêtent à la recherche

### 5.1. Modalités de réalisation du prélèvement d'endomètre en pratique courante (groupe « cas »)

En cas d'EIR ou de FCR-I, nous réalisons en pratique courante de manière systématique un prélèvement d'endomètre afin d'analyser le tissu endométrial notamment pour rechercher une endométrite chronique. Ce prélèvement d'endomètre est fait au jour 21 (+/- 2 jours) du cycle précédent un nouveau cycle de FIV ou de transfert d'embryon congelé afin de provoquer un effet « scratching » pouvant favoriser l'implantation lors du prochain transfert d'embryon frais ou congelé (65,66). Nous programmons ce prélèvement 5 à 9 jours après la date supposée de l'ovulation, celle-ci est estimée en fonction de la durée des cycles. Associé à ce prélèvement d'endomètre, nous réalisons toujours un bilan sanguin à jeun dans le cadre du bilan étiologique d'EIR ou de FCSR-I.

Les patientes réalisent une auto-évaluation de l'ovulation par kit urinaire. Cette auto-évaluation est faite quotidiennement une fois par jour à domicile à partir du 10ème jour du cycle en cas de cycles de 28 jours ou à partir du 8ème jour du cycle en cas de cycles inférieurs à 26 jours ou à partir du 12ème jour du cycle en cas de cycles supérieurs à 30 jours.

La positivité du test permet d'identifier le pic de LH et donc de déterminer le jour de l'ovulation qui survient 24h après la positivité du test. La patiente est alors invitée à prendre rendez-vous, à jeun, 6 à 10 jours après la positivité du test d'ovulation afin de réaliser une prise de sang et un prélèvement d'endomètre lors de la fenêtre d'implantation.

Au cours de ce rendez-vous, une prise de sang est réalisée dans le cadre de la prise en charge de routine avec prélèvement de deux tubes de plasma hépariné de 4 mL supplémentaires pour la collection « Fertilité » pour les femmes ayant accepté d'être incluses dans la biocollection. Le prélèvement est réalisé par une des infirmières ou sages-femmes du service.

Ensuite, le prélèvement d'endomètre est réalisé selon les pratiques habituelles en gynécologie. La patiente est installée sur une table d'examen en position gynécologique. Un spéculum est posé afin de bien exposer le col de l'utérus. Une pipelle de Cornier (laboratoire CCD®) est utilisée afin de réaliser le prélèvement d'endomètre par aspiration endo-utérine après avoir nettoyé le col de l'utérus avec une compresse imbibée de sérum physiologique

Les couples doivent avoir des rapports sexuels protégés par préservatifs durant le cycle menstruel à l'étude.

## **5.2. Modalités de réalisation du prélèvement d'endomètre pour la recherche (groupe « témoins »)**

Nous proposons aux patientes du groupe « témoins » d'ajouter un prélèvement sanguin et un prélèvement d'endomètre à leur bilan d'infertilité dans le cadre d'une recherche interventionnelle sur la personne humaine.

La procédure (prélèvement sanguin et prélèvement d'endomètre) qui est appliquée pour les patientes du groupe « témoins » est strictement identique à celle précédemment décrite dans le cadre de la prise en charge de routine pour les patientes « cas » ayant accepté d'être incluses dans la biocollection mis à part que les patientes du groupe « témoin » ne font pas d'auto-évaluation de l'ovulation par kit urinaire.

## **5.3. Prise en charge et traitements associés**

La seule spécificité de cette étude est la réalisation d'un prélèvement d'endomètre et d'un prélèvement sanguin à jeun autour du jour 21 du cycle pour les patientes du groupe témoin. Les prises en charge des patientes sont poursuivies pendant la durée de l'étude conformément aux pratiques habituelles et peuvent être modifiées par les médecins référents des patientes sans remettre en cause leur participation à l'étude.

# **6. Déroulement de la recherche**

## **6.1. Pré-sélection / Recrutement des patientes du groupe témoin**

La pré-sélection des patientes est réalisée par l'investigateur ou les co-investigateurs à partir de leur dossier médical, selon les différents critères de sélection évaluables à cette date, et sans en avertir la patiente.

Le recrutement des patientes est fait lors d'une consultation de routine avec l'un des gynécologues de notre équipe d'AMP. Cette consultation a lieu soit dans un contexte de première consultation dans le service (avec bilans d'infertilité masculin et féminin déjà réalisés), soit lors d'un suivi. A l'occasion de cette consultation de routine, si la patiente remplit les critères de sélection de l'étude, l'étude lui est présentée et la lettre d'information écrite lui est remise. Si la patiente accepte de participer à l'étude, elle recontacte le service pour programmer la visite d'inclusion entre J19 et J23.

## 6.2. Procédure d'inclusion des patientes du groupe témoin

Lors de la visite d'inclusion, si la patiente remplit toujours les critères de sélection de l'étude, son consentement est recueilli par l'investigateur après un entretien et la délivrance de la lettre d'information écrite dans un langage compréhensible par la patiente.

Le recueil du consentement de la patiente est tracé dans le dossier médical de la patiente. L'investigateur écrit la phrase suivante :

« Le Dr/Pr \_\_\_\_\_ a présenté l'étude ENDOMETAB à Mme \_\_\_\_\_ le \_\_/\_\_/\_\_\_\_. Cette dernière a consenti le \_\_/\_\_/\_\_\_\_ a participé à l'étude ENDOMETAB. ».

Le consentement est signé en 3 exemplaires : un exemplaire remis à la patiente, un exemplaire pour le dossier médical et un exemplaire pour le Centre de Ressources Biologiques (CRB).

## 6.3. Suivi des personnes se prêtant à la recherche

Après l'inclusion, toutes les informations habituelles disponibles dans le dossier d'AMP sont recueillies dans le cahier d'observation de l'étude : âge, poids, tabagisme, consommation de toxiques ou d'alcool, traitements pris, antécédents médico-chirurgicaux, antécédents gynécologiques, antécédents obstétricaux, antécédents familiaux, examens déjà réalisés (bilan hormonal, échographie pelvienne, hystérosalpingographie ou hystérosonographie), étiologie(s) de l'infertilité.

Les prélèvements sont ensuite réalisés. Les modalités pratiques de réalisation des prélèvements sont détaillées dans le chapitre 5.

## 6.4. Préparation et conservation des échantillons biologiques

Le contenu de la pipette de Cornier sera inséré dans un tube sec stérile de 2 mL type Eppendorf avant d'être rapidement transmis (avec le prélèvement sanguin) dans la glace au CRB du CHU d'Angers.

Une partie du prélèvement sera envoyée en analyse anatomopathologique et l'autre partie sera envoyée au CRB.

Les échantillons biologiques seront préparés et conservés au CRB du CHU d'Angers avant envoi au laboratoire de biochimie et biologie moléculaire du CHU d'Angers pour analyse métabolomique.

Le tissu récupéré par le prélèvement sera rincé rapidement au sérum physiologique à +4°C puis centrifuger.

Le tissu sera alors séparé en 2 morceaux (2 tubes) conservés dans de l'azote liquide.

## 6.5. Analyse métabolomique des échantillons biologiques

Tous les échantillons des témoins seront analysés à la fin de l'étude par le laboratoire de Biochimie et biologie moléculaire du CHU d'Angers.

Les prélèvements de tissu endométrial seront tout d'abord broyés (Précellys) dans du méthanol afin d'extraire les métabolites polaires et non polaires. Les extraits seront analysés sur un spectromètre de masse AB Sciex QTRAP 5500 (Life Sciences SCIEX) grâce au kit Biocrates AbsoluteIDQ p180 kit (Biocrates Life sciences). L'utilisation de ce kit permet une approche semi-quantitative ou quantitative de 188 métabolites de manière standardisée. Il comporte différents contrôles de qualité et des étalons permettant cette quantification précise sur une large gamme de concentrations. Le logiciel associé à ce kit produira un rapport de qualité des dosages réalisé ainsi qu'un tableau Excel comportant l'ensemble des données (n = 15040 données issues de 188 dosages sur 80 échantillons). Seules les données répondant aux critères de quantification (dans la gamme de quantification) seront conservées pour la suite. Un dosage de protéines sera réalisé sur l'extrait de départ afin de normaliser ces données, la concentration de chaque métabolite sera ainsi présentée par mg de protéine. Ces données normalisées seront celles utilisées pour les études statistiques.

Les échantillons de sang seront également analysés avec un spectromètre de masse AB Sciex QTRAP 5500 (Life Sciences SCIEX) grâce au kit Biocrates AbsoluteIDQ p180 kit (Biocrates Life sciences).

Le temps technique pour les analyses métabolomiques sera de 2 jours par échantillon.

Les 188 métabolites dosés sont les suivants : 40 acyl-carnitines, 21 acides aminés, 21 amines biogènes, 90 glycérophospholipides, 15 sphingolipides, et sucres (n = 1).

## 6.6. Durée de la recherche

Durée de la période d'inclusion : 24 mois.

Durée de participation à l'étude pour un participant : 1 visite.

Durée totale de l'étude (durée d'inclusion + durée de participation) : 24 mois.

Première inclusion faite le 06/09/2019.

## 7. Considérations éthiques et réglementaires

### 7.1. Qualification de la recherche

C'est une recherche impliquant la personne humaine de type recherche interventionnelle (catégorie 1) car la réalisation de prélèvements d'endomètre est un acte spécifique à la recherche non réalisé en routine chez ces patientes (témoins).

### 7.2. Comité d'éthique et Autorité compétente

Le dossier de l'étude (notamment le protocole, le résumé, la liste des investigateurs associés, la lettre d'information et le formulaire de consentement de l'étude) a été soumis au Comité de Protection des Personnes (CPP) Sud-EST VI qui a émis un avis favorable à la mise en œuvre de cette recherche le 25 mars 2019. L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et produits de santé (ANSM) a autorisé la recherche le 27 septembre 2018.

## Conclusion

Nous avons, au cours de nos travaux, tenté d'approcher les mécanismes physiopathologiques liés à l'endométriose et au vieillissement ovarien en étudiant l'impact que ces pathologies pouvaient avoir sur le micro environnement ovocytaire. Nous avons, déterminé dans le fluide folliculaire des signatures spécifiques de la pathologie en elle-même et, dans certains cas, d'éventuels biomarqueurs.

En cas d'infertilité lié à une endométriose isolée, nous n'avons pas retrouvé d'altération du profil métabolique dans le fluide folliculaire. Nos résultats suggèrent qu'il n'existerait pas d'anomalies de l'environnement ovocytaire susceptible d'être lié à une altération de la qualité ovocytaire en cas d'endométriose isolée.

En cas d'endométriose sévère, nos données sur l'analyse des cytokines suggèrent que l'endométriose entraîne une expression différente de MCP1 dans le fluide folliculaire, en fonction des patientes. Nous constatons aussi une modification du microenvironnement ovocytaire en cas d'endométriose sévère associé à des niveaux de MCP-1 élevé. Il pourrait donc exister un sous-groupe d'endométriose sévère dont le pronostic serait plus réservé en relation avec un contexte inflammatoire intra-folliculaire. L'existence de sous-populations endométriosiques, comme celle que nous avons mise en évidence ici grâce à MCP1, pourrait expliquer la discordance des études antérieures. En outre, il conviendrait de reconsidérer l'intérêt de MCP1 en tant que biomarqueur dans le cadre de l'endométriose et notamment de réévaluer son dosage sanguin pour prédire la réponse ovarienne à la stimulation afin de prendre en compte cette hétérogénéité inattendue.

En cas de réserve ovarienne diminuée, une diminution des plasmalogènes insaturés et une augmentation de l'activité méthyl transférase évoquent un contexte de stress oxydant au sein du fluide folliculaire. De plus larges analyses métabolomiques non ciblées du FF permettront certainement une meilleure compréhension du rôle joué par d'autres lipides tels que les éthanolamines plasmalogènes et leur interaction avec les cholines plasmalogènes. D'autres études sont donc nécessaires pour explorer les différentes voies métaboliques dans lesquels de tels composants sont impliqués et ainsi mieux comprendre les phénomènes physiopathologiques survenant en cas de ROD.



L'analyse des profils cytokiniques du FF a permis de constater une diminution significative des concentrations de PDGF-BB en cas de réserve ovarienne diminuée. Par conséquent, une infertilité liée à une réserve ovarienne diminuée pourrait être associée à une altération de voies métaboliques impliquant le PDGF-BB et pouvant être à l'origine de perturbation de la folliculogénèse ou des défenses antioxydantes. Enfin, nos futurs travaux s'intéresseront à la découverte éventuelle de biomarqueurs et à l'amélioration de la compréhension des mécanismes intervenant chez des femmes atteintes de fausses couches à répétition ou ayant vécu des échecs d'implantation répétés lors d'une prise en charge en FIV.

# Bibliographie

1. Loi n°2011-814 relative à la bioéthique. Journal Officiel de la République Française 2011;157:11826.
2. De La Rochebrochard E. Un enfant sur 30 conçu par AMP en France. Bulletin mensuel d'information de l'Institut National des Études Démographiques 2018 ;556:1-4.
3. Hamamah S. Omics as a tool for ART. Gynecol Obstet Fertil 2011;39:1-2.
4. Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. Plant Mol Biol 2002;48:155-71.
5. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013. Nucleic Acids Res 2013;41:D801-807.
6. Dettmer K, Hammock BD. Metabolomics-a new exciting field within the « omics » sciences. Environ Health Perspect 2004;112:A396-397.
7. Bracewell-Milnes T, Saso S, Abdalla H, Nikolau D, Norman-Taylor J, Johnson M, et al. Metabolomics as a tool to identify biomarkers to predict and improve outcomes in reproductive medicine: a systematic review. Hum Reprod Update 2017;23:723-36.
8. Kosteria I, Anagnostopoulos AK, Kanaka-Gantenbein C, Chrousos GP, Tsangaris GT. The Use of Proteomics in Assisted Reproduction. In Vivo 2017;31:267-83.
9. Collinet P, Fritel X, Revel-Delhom C, Ballester M, Bolze PA, Borghese B, et al. Management of endometriosis. J Gynecol Obstet Hum Reprod 2018;47:265-74.
10. Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, d'Hooghe T, de Cicco Nardone F, de Cicco Nardone C, et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. Fertil Steril 2011;96:366-373.e8.
11. Drew U. Atlas de poche d'embryologie, Flammarion, Médecine Sciences 1994:24-27.
12. te Velde ER. The variability of female reproductive ageing. Hum Reprod Update 2002;8:141-54.
13. Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, et al. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. Hum Reprod 2005;20:35-48.
14. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demirol A, Gurgan T, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. Reprod Biomed Online 2014;28:14-38.
15. Kitaya K, Matsubayashi H, Takaya Y, Nishiyama R, Yamaguchi K, Takeuchi T, et al. Live birth rate following oral antibiotic treatment for chronic endometritis in infertile women with repeated implantation failure. Am J Reprod Immunol 2017;78:e12719.
16. Kolte AM, Bernardi LA, Christiansen OB, Quenby S, Farquharson RG, Goddijn M, et al. Terminology for pregnancy loss prior to viability: a consensus statement from the ESHRE early pregnancy special interest group. Hum Reprod 2015;30:495-8.
17. Jauniaux E. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. Hum Reprod 2006;21:2216-22.
18. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, Scientific Advisory Committee, Guideline No. 17. The Investigation and treatment of couples with recurrent miscarriage. Published May 2011. Available at: <http://www.rcog.org.uk/womens-health/clinical-guidance/investigation-and-treatment-couples-recurrent-miscarriage-green-top>.
19. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. Fertil Steril 2009;92:1520-4.
20. Leenders J, Frédéric M, de Tullio P. Nuclear magnetic resonance: a key metabolomics platform in the drug discovery process. Drug Discov Today Technol 2015;13:39-46.
21. Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, Eghbalnia HR, Powers R, Raftery D, et al. The future of NMR-based metabolomics. Curr Opin Biotechnol 2017;43:34-40.

22. Collino S, Martin F-P, Karagounis LG, Horcajada MN, Moco S, Franceschi C, et al. Reprint of: Musculoskeletal system in the old age and the demand for healthy ageing biomarkers. *Mech Ageing Dev* 2014;136-137:94-100.
23. Ruoppolo M, Scolamiero E, Caterino M, Mirisola V, Franconi F, Campesi I. Female and male human babies have distinct blood metabolomic patterns. *Mol Biosyst* 2015;11:2483-92.
24. Scalbert A, Brennan L, Manach C, Andres-Lacueva C, Dragsted LO, Draper J, et al. The food metabolome: a window over dietary exposure. *Am J Clin Nutr* 2014;99:1286-308.
25. Emwas A-H, Luchinat C, Turano P, Tenori L, Roy R, Salek RM, et al. Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc* 2015;11:872-94.
26. Zacharias HU, Altenbuchinger M, Gronwald W. Statistical Analysis of NMR Metabolic Fingerprints: Established Methods and Recent Advances. *Metabolites* 2018;8:1-10.
27. Barnes S, Benton HP, Casazza K, Cooper SJ, Cui X, Du X, et al. Training in metabolomics research. II. Processing and statistical analysis of metabolomics data, metabolite identification, pathway analysis, applications of metabolomics and its future: Interpreting data from a metabolomics experiment. *J Mass Spectrom* 2016;51:535-48.
28. Waterman DS, Bonner FW, Lindon JC. Spectroscopic and statistical methods in metabolomics. *Bioanalysis* 2009;1:1559-78.
29. Chao De La Barca JM, Mirebeau-Prunier D, Moal V, Reynier P, Garnotel R, Simard G. [Metabolome and mass spectrometry: new biomedical analysis perspectives]. *Ann Biol Clin* 2015;73:126-30.
30. May KE, Conduit-Hulbert SA, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2010;16:651-74.
31. Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med* 2009;360:268-79.
32. Cordeiro FB, Cataldi TR, Perkel KJ, do Vale Teixeira da Costa L, Rochetti RC, Stevanato J, et al. Lipidomics analysis of follicular fluid by ESI-MS reveals potential biomarkers for ovarian endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:1817-25.
33. Marianna S, Alessia P, Susan C, Francesca C, Angela S, Francesca C, et al. Metabolomic profiling and biochemical evaluation of the follicular fluid of endometriosis patients. *Mol Biosyst* 2017;13:1213-22.
34. Sun Z, Song J, Zhang X, Wang A, Guo Y, Yang Y, et al. Novel SWATHMS technology for follicular fluid metabolomics in patients with endometriosis. *Pharmazie* 2018;73:318-23.
35. Karaer A, Tuncay G, Mumcu A, Dogan B. Metabolomics analysis of follicular fluid in women with ovarian endometriosis undergoing in vitro fertilization. *Syst Biol Reprod Med* 2018;1-9.
36. Coutinho LM, Ferreira MC, Rocha ALL, Carneiro MM, Reis FM. New biomarkers in endometriosis. *Adv Clin Chem* 2019;89:59-77.
37. Zhou W-J, Yang H-L, Shao J, Mei J, Chang K-K, Zhu R, et al. Anti-inflammatory cytokines in endometriosis. *Cell Mol Life Sci* 2019;76:2111-32.
38. Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Comparison between cytokine concentration in follicular fluid of poor and high responder patients and their influence of ICSI-outcome. *Am J Reprod Immunol* 2003;50:131-6.
39. Singh AK, Dutta M, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Intrafollicular interleukin-8, interleukin-12, and adrenomedullin are the promising prognostic markers of oocyte and embryo quality in women with endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 2016;33:1363-72.
40. Wu G, Bersinger NA, Mueller MD, von Wolff M. Intrafollicular inflammatory cytokines but not steroid hormone concentrations are increased in naturally matured follicles of women with proven endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 2017;34:357-64.
41. Fujii EY, Nakayama M. The measurements of RAGE, VEGF, and AGEs in the plasma and follicular fluid of reproductive women: the influence of aging. *Fertil Steril* 2010;94:694-700.
42. Tatone C, Heizenrieder T, Di Emidio G, Treffon P, Amicarelli F, Seidel T, et al. Evidence that carbonyl stress by methylglyoxal exposure induces DNA damage and spindle aberrations, affects mitochondrial integrity in mammalian oocytes and contributes to oocyte ageing. *Hum Reprod* 2011;26:1843-59.

43. Stensen MH, Tanbo T, Storeng R, Fedorcsak P. Advanced glycation end products and their receptor contribute to ovarian ageing. *Hum Reprod* 2014;29:125-34.
44. Pacella L, Zander-Fox DL, Armstrong DT, Lane M. Women with reduced ovarian reserve or advanced maternal age have an altered follicular environment. *Fertil Steril* 2012;98:986-994.e1-2.
45. Hashemitabar M, Bahmanzadeh M, Mostafaie A, Orazizadeh M, Farimani M, Nikbakht R. A proteomic analysis of human follicular fluid: comparison between younger and older women with normal FSH levels. *Int J Mol Sci* 2014;15:17518-40.
46. Von Wald T, Monisova Y, Hacker MR, Yoo SW, Penzias AS, Reindollar RR, et al. Age-related variations in follicular apolipoproteins may influence human oocyte maturation and fertility potential. *Fertil Steril* 2010;93:2354-61.
47. Cataldi T, Cordeiro FB, Costa L do VT da, Pilau EJ, Ferreira CR, Gozzo FC, et al. Lipid profiling of follicular fluid from women undergoing IVF: young poor ovarian responders versus normal responders. *Hum Fertl Camb* 2013;16:269-77.
48. Baskind NE, Orsi NM, Sharma V. Follicular-phase ovarian follicular fluid and plasma cytokine profiling of natural cycle in vitro fertilization patients. *Fertil Steril* 2014;102:410-8.
49. Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril*.2015;103:303-16.
50. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 2008;14:159-77.
51. Bedaiwy M, Shahin AY, AbulHassan AM, Goldberg JM, Sharma RK, Agarwal A, et al. Differential expression of follicular fluid cytokines: relationship to subsequent pregnancy in IVF cycles. *Reprod Biomed Online* 2007;15:321-5.
52. Lédée N, Lombroso R, Lombardelli L, Selva J, Dubanchet S, Chaouat G, et al. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Hum Reprod* 2008;23:2001-9.
53. Taghavi SA, Ashrafi M, Mehdizadeh M, Karimian L, Joghataie MT, Aflatoonian R. Toll-like receptors expression in follicular cells of patients with poor ovarian response. *Int J Fertil Steril* 2014;8:183-92.
54. Nuñez-Calonge R, Cortés S, Gutierrez Gonzalez LM, Kireev R, Vara E, Ortega L, et al. Oxidative stress in follicular fluid of young women with low response compared with fertile oocyte donors. *Reprod Biomed Online* 2016;32:446-56.
55. Vilella F, Ramirez LB, Simón C. Lipidomics as an emerging tool to predict endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2013;99:1100-6.
56. Siristatidis CS, Maheshwari A, Vaidakis D, Bhattacharya S. In vitro maturation in subfertile women with polycystic ovarian syndrome undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2018;11:CD006606.
57. Achache H, Tsafrir A, Prus D, Reich R, Revel A. Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2010;94:1271-8.
58. Pusey J, Kelly WA, Bradshaw JM, Porter DG. Myometrial activity and the distribution of blastocysts in the uterus of the rat: interference by relaxin. *Biol Reprod* 1980;23:394-7.
59. Fanchin R, Picone O, Ayoubi JM, Marcadet-Fredet S, Kadoch J, Frydman R. Uterine contractility and reproduction: new perspectives. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2002;31:325-32.
60. Swahn ML, Bygdeman M. The effect of the antiprogestin RU 486 on uterine contractility and sensitivity to prostaglandin and oxytocin. *BJOG* 1988;95:126-34.
61. Banerjee P, Dutta M, Srivastava S, Joshi M, Chakravarty B, Chaudhury K. (1)H NMR serum metabolomics for understanding metabolic dysregulation in women with idiopathic recurrent spontaneous miscarriage during implantation window. *J Proteome Res* 2014;13:3100-6.
62. RoyChoudhury S, Singh A, Gupta NJ, Srivastava S, Joshi MV, Chakravarty B, et al. Repeated implantation failure versus repeated implantation success: discrimination at a metabolomic level. *Hum Reprod* 2016;31:1265-74.

63. Bouet P-E, El Hachem H, Monceau E, Gariépy G, Kadoch I-J, Sylvestre C. Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis. *Fertil Steril* 2016;105:106-10.
64. Huchon C, Deffieux X, Beucher G, Capmas P, Carcopino X, Costedoat-Chalumeau N, et al. Pregnancy loss: French clinical practice guidelines. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2016;201:18-26.
65. Nasti CO, Ferriani RA, Raine-Fenning N, Martins WP. Endometrial scratching performed in the non-transfer cycle and outcome of assisted reproduction: a randomized controlled trial. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;42:375-82.
66. Lensen S, Sadler L, Farquhar C. Endometrial scratching for subfertility: everyone's doing it. *Hum Reprod* 2016;31:1241-4.

# Table des matières

## REMERCIEMENTS

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

LA METABOLOMIQUE.....	6
-----------------------	---

1. Approche métabolomique ciblée ou non ciblée .....	6
2. Les différentes techniques analytiques en métabolomique .....	6
2.1. La spectroscopie par RMN .....	7
2.2. La spectrométrie de masse (MS <i>Mass spectrometry</i> ) .....	7
2.2.1. Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS).....	8
2.2.2. Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide (LC-MS).....	8
3. Déroulement d'une analyse métabolomique .....	9
3.1.1. Préparation des échantillons .....	9
3.1.2. Techniques analytiques (RMN, MS).....	9
3.1.3. Traitement des données .....	10
3.1.4. Analyses statistiques .....	12
a) Analyses univariées.....	12
a) Analyses multivariées.....	12

L'ANALYSE METABOLOMIQUE DU FLUIDE FOLLICULAIRE (FF) ET DU PROFIL CYTOKINIQUE CHEZ DES FEMMES ATTEINTES D'ENDOMETRIOSE .....	18
---	----

1. Recherche de biomarqueurs par analyse métabolomique ciblée du FF chez des femmes atteintes d'endométriose isolée .....	18
2. Recherche de biomarqueurs par analyse des cytokines dans le FF de femmes atteintes d'endométriose sévère.....	28

L'ANALYSE METABOLOMIQUE DU FLUIDE FOLLICULAIRE (FF) ET DU PROFIL CYTOKINIQUE CHEZ DES FEMMES AYANT UNE RESERVE OVARIENNE DIMINUEE .....	57
---	----

1. Recherche de biomarqueurs par analyse métabolomique ciblée du FF chez des femmes ayant une réserve ovarienne diminuée .....	57
2. Recherche d'un profil cytokinique dans le FF de femmes ayant une réserve ovarienne diminuée.....	69

PERSPECTIVES : RECHERCHE PAR METABOLOMIQUE DE BIOMARQUEURS ENDOMETRIAUX DANS LES FAUSSES-COUCHES SPONTANÉES A REPETITION ET LES ECHECS D'IMPLANTATION REPETES APRES FIV, PROJET ENDOMETAB .....	86
---	----

1. Contexte et justification de la recherche .....	86
1.1. Etat actuel des connaissances.....	86
1.2. Hypothèses de la recherche.....	91
2. Objectifs de la recherche et critères d'évaluation .....	92
2.1. Objectif et critère d'évaluation principal.....	92
2.2. Objectifs et critères d'évaluation secondaires.....	92
3. Conception de la recherche.....	92
3.1. Schéma de la recherche .....	92
3.2. Justification du nombre de personnes à inclure dans la recherche .....	94
4. Sélection des personnes de la recherche .....	94
4.1. Critères de sélection des patientes dans les groupes « cas » (déjà incluses dans la « collection fertilité ») .....	94
4.1.1. Critères d'inclusion pour les cas .....	94
4.1.2. Critères de non-inclusion pour les cas .....	95
4.2. Critères de sélection des personnes qui se prêtent à la recherche (groupe « témoin ») .....	96
4.2.1. Critères d'inclusion pour les témoins .....	96
4.2.2. Critères de non-inclusion pour les témoins.....	96
5. Prise en charge et traitements administrés aux personnes qui se prêtent à la recherche .....	97
5.1. Modalités de réalisation du prélèvement d'endomètre en pratique courante (groupe « cas ») .....	97
5.2. Modalités de réalisation du prélèvement d'endomètre pour la recherche (groupe « témoins »).....	98



5.3.	Prise en charge et traitements associés .....	98
<b>6.</b>	<b>Déroulement de la recherche .....</b>	<b>98</b>
6.1.	Pré-sélection / Recrutement des patientes du groupe témoin .....	98
6.2.	Procédure d'inclusion des patientes du groupe témoin .....	99
6.3.	Suivi des personnes se prêtant à la recherche .....	99
6.4.	Préparation et conservation des échantillons biologiques .....	100
6.5.	Analyse métabolomique des échantillons biologiques .....	100
6.6.	Durée de la recherche .....	101
<b>7.</b>	<b>Considérations éthiques et réglementaires .....</b>	<b>101</b>
7.1.	Qualification de la recherche .....	101
7.2.	Comité d'éthique et Autorité compétente .....	101
<b>CONCLUSION .....</b>		<b>102</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>104</b>

## RÉSUMÉ

Nous avons, au cours de nos travaux, tenté d'approcher les mécanismes physiopathologiques liés au vieillissement ovarien et à l'endométriose en étudiant l'impact que ces pathologies pouvaient avoir sur le micro environnement ovocytaire. Nous avons, déterminé dans le fluide folliculaire des signatures spécifiques de la pathologie et, dans certains cas, d'éventuels biomarqueurs.

En cas d'infertilité lié à une endométriose isolée, nous n'avons pas retrouvé d'altération du profil métabolique dans le fluide folliculaire. Nos résultats suggèrent qu'il n'existerait pas d'anomalies de l'environnement ovocytaire susceptible d'être lié à une altération de la qualité ovocytaire en cas d'endométriose isolée.

En cas d'endométriose sévère, nos données sur l'analyse des cytokines suggèrent que l'endométriose entraîne une expression différente de MCP1 dans le fluide folliculaire, en fonction des patientes. Nous constatons aussi une modification du microenvironnement ovocytaire en cas d'endométriose sévère associé à des niveaux de MCP-1 élevé. En cas de réserve ovarienne diminuée, une diminution des plasmalogènes insaturés et une augmentation de l'activité méthyl transférase évoquent un contexte de stress oxydant au sein du fluide folliculaire.

L'analyse des profils cytokiniques du FF a permis de constater une diminution significative des concentrations de PDGF-BB en cas de réserve ovarienne diminuée. Par conséquent, une infertilité liée à une réserve ovarienne diminuée pourrait être associée à une altération de voies métaboliques impliquant le PDGF-BB et pouvant être à l'origine de perturbation de la folliculogénèse ou des défenses antioxydantes.

Enfin, nos futurs travaux s'intéresseront à la découverte éventuelle de biomarqueurs et à l'amélioration de la compréhension des mécanismes intervenant chez des femmes atteintes de fausses couches à répétition ou ayant vécu des échecs d'implantation répétés lors d'une prise en charge en FIV.

**mots-clés :** endometriose, réserve ovarienne diminuée, vieillissement ovarien, fluide folliculaire, FIV, lipidomique, métabolomique, ovocyte, cytokines, choline plasmalogènes, total diméthylarginine, MCP-1, platelet-derived growth factor BB.

## ABSTRACT

During the course of our research, we sought to analyze the pathophysiological mechanisms incriminated in ovarian aging and endometriosis, by studying the possible impact of these conditions on the oocyte micro-environment. We have identified specific signatures for these pathologies in the follicular fluid, and in some cases, potential biomarkers.

In cases of infertility secondary to isolated endometriosis, we did not find any alteration of the metabolic profile of the follicular fluid. The absence of an alteration in the oocyte micro-environment in women with endometriosis suggests that there is no impact of the disease on the oocyte quality. However, in cases of severe endometriosis, cytokine analysis showed that, in some patients, there is a different expression of MCP1 in the follicular fluid. We also found a modification of the oocyte micro-environment in severe endometriosis, associated with high levels of MCP1.

In cases of low ovarian reserve, we found decreased levels of unsaturated plasmalogens and an increase in the methyl-transferase activity, suggesting oxidative stress in the follicular fluid. Moreover, the analysis of the cytokines profile showed a significant decrease in PDGF-BB concentrations in patients with low ovarian reserve. The alteration of the metabolic pathways implicating PDGF-BB could negatively impact folliculogenesis and the antioxidant defense mechanisms, and could therefore be linked to the infertility seen in patients with low ovarian reserve.

Finally, our future research will look to identify eventual biomarkers and to improve our understanding of the pathophysiologic mechanisms involved in recurrent pregnancy losses and recurrent implantation failures following in vitro fertilization treatment.

**keywords :** endometriosis, diminished ovarian reserve, ovarian ageing, follicular fluid, IVF, lipidomics, metabolomics, oocyte, cytokines, choline plasmalogens, total dimethylarginine, MCP-1, platelet-derived growth factor BB.

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) BOUET Pierre-Emmanuel.....  
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une  
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,  
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.  
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées  
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **28 / 10 / 2019**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint  
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université  
40 rue de rennes - BP 73532  
49035 Angers cedex

Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



**Titre :** Recherche de biomarqueurs par approche métabolomique et cytokinique en assistance médicale à la procréation

**Mots clés :** endométriose, réserve ovarienne diminuée, fluide folliculaire, métabolomique, cytokines

**Résumé :** Nous avons, au cours de nos travaux, tenté d'approcher les mécanismes physiopathologiques liés au vieillissement ovarien et à l'endométriose en étudiant l'impact que ces pathologies pouvaient avoir sur le micro environnement ovocytaire. Nous avons, déterminé dans le fluide folliculaire des signatures spécifiques de la pathologie et, dans certains cas, d'éventuels biomarqueurs.

En cas d'infertilité lié à une endométriose isolée, nous n'avons pas retrouvé d'altération du profil métabolique dans le fluide folliculaire. Nos résultats suggèrent qu'il n'existerait pas d'anomalies de l'environnement ovocytaire susceptible d'être lié à une altération de la qualité ovocytaire en cas d'endométriose isolée.

En cas d'endométriose sévère, nos données sur l'analyse des cytokines suggèrent que l'endométriose entraîne une expression différente de MCP1 dans le fluide folliculaire, en fonction des patientes. Nous constatons aussi une modification du microenvironnement ovocytaire en cas d'endométriose sévère associé à des niveaux de MCP-1 élevé.

En cas de réserve ovarienne diminuée, une diminution des plasmalogènes insaturés et une augmentation de l'activité méthyl transférase évoquent un contexte de stress oxydant au sein du fluide folliculaire.

L'analyse des profils cytokiniques du FF a permis de constater une diminution significative des concentrations de PDGF-BB en cas de réserve ovarienne diminuée. Par conséquent, une infertilité liée à une réserve ovarienne diminuée pourrait être associée à une altération de voies métaboliques impliquant le PDGF-BB et pouvant être à l'origine de perturbation de la folliculogénèse ou des défenses antioxydantes.

Enfin, nos futurs travaux s'intéresseront à la découverte éventuelle de biomarqueurs et à l'amélioration de la compréhension des mécanismes intervenant chez des femmes atteintes de fausses couches à répétition ou ayant vécu des échecs d'implantation répétés lors d'une prise en charge en FIV.

**Title :** Identification of biomarkers in assisted reproductive technologies using metabolomics and cytokinics approach

**Keywords :** endometriosis, diminished ovarian reserve, follicular fluid, metabolomic, cytokines

**Abstract :** During the course of our research, we sought to analyze the pathophysiological mechanisms incriminated in ovarian aging and endometriosis, by studying the possible impact of these conditions on the oocyte micro-environment. We have identified specific signatures for these pathologies in the follicular fluid, and in some cases, potential biomarkers.

In cases of infertility secondary to isolated endometriosis, we did not find any alteration of the metabolic profile of the follicular fluid. The absence of an alteration in the oocyte micro-environment in women with endometriosis suggests that there is no impact of the disease on the oocyte quality. However, in cases of severe endometriosis, cytokine analysis showed that, in some patients, there is a different expression of MCP1 in the follicular fluid. We also found a modification of the oocyte micro-environment in severe endometriosis, associated with high levels of MCP1.

In cases of low ovarian reserve, we found decreased levels of unsaturated plasmalogens and an increase in the methyl-transferase activity, suggesting oxidative stress in the follicular fluid. Moreover, the analysis of the cytokines profile showed a significant decrease in PDGF-BB concentrations in patients with low ovarian reserve. The alteration of the metabolic pathways implicating PDGF-BB could negatively impact folliculogenesis and the antioxidant defense mechanisms, and could therefore be linked to the infertility seen in patients with low ovarian reserve.

Finally, our future research will look to identify eventual biomarkers and to improve our understanding of the pathophysiological mechanisms involved in recurrent pregnancy losses and recurrent implantation failures following in vitro fertilization treatment.