



**HAL**  
open science

# Réceptivité endométriale et qualité embryonnaire : deux paramètres à améliorer pour augmenter les taux de naissances vivantes en assistance médicale à la procréation

Chloé Baron

## ► To cite this version:

Chloé Baron. Réceptivité endométriale et qualité embryonnaire : deux paramètres à améliorer pour augmenter les taux de naissances vivantes en assistance médicale à la procréation. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTT074 . tel-03605821

**HAL Id: tel-03605821**

**<https://theses.hal.science/tel-03605821>**

Submitted on 11 Mar 2022

**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.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En biologie de la reproduction

École doctorale CBS2 Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche U1203 Développement Embryonnaire, Fertilité et Environnement

Réceptivité endométriale et qualité embryonnaire :  
deux paramètres à améliorer pour augmenter les taux de  
naissances vivantes en assistance médicale à la procréation

Présentée par Chloé BARON

Le 17 décembre 2021

Sous la direction du Pr Samir HAMAMAH  
et du Dr Sophie BROUILLET

Devant le jury composé de

Paul BARRIERE, PU-PH, Université de Nantes

Catherine PATRAT, PU-PH, Université Paris V

Samir HAMAMAH, PU-PH, Université de Montpellier

Sophie BROUILLET, MCU-PH, Université de Montpellier

Stéphanie HUBERLANT, MCU-PH, Université de Montpellier

David GENEVIEVE, PU-PH, Université de Montpellier

Président du jury

Rapporteur

Directeur

Co-directrice

Invitée

Invité



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



# Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont encouragée, épaulée et qui ont rendu possible cette thèse.

A mon directeur de thèse, Monsieur le Pr. Samir Hamamah. Je vous adresse mes sincères remerciements. Vous avez su me faire confiance dès notre premier entretien. Je vous remercie de vos précieux conseils, qui m'ont guidé tout au long de ces trois années de recherche.

A ma co-directrice de thèse, Madame le Dr Sophie Brouillet. Depuis notre premier échange en 2015, il s'est passé beaucoup de choses. Tu m'as accordé ta confiance pour m'encadrer sur mon stage de M2 puis tu m'as donné l'envie de continuer vers la recherche. J'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci de m'avoir transmis tes connaissances, merci de m'avoir guidée tout au long de ces années de recherche, merci pour ta réactivité et de tes conseils judicieux. Grâce à toi je termine ces trois années de thèse grandie. J'ai adoré travailler avec une personne sincère et brillante comme toi.

Aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail et de partager leurs expertises. A Madame le Pr Catherine Patrat et à Monsieur le Pr Paul Barrière qui ont accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit de thèse, je vous remercie.

A mon jury de comité de suivi, Mme le Dr Nadia Alfaidy et Mme de Dr Gina Devau. Merci d'avoir été à l'écoute, merci pour votre soutien et votre gentillesse.

A la directrice de l'unité de recherche, Mme le Pr Françoise Paris. Je vous remercie de vos conseils et pour votre implication.

A Gedeon Richter. Merci d'avoir soutenu financièrement ce travail.

A mes collègues de l'U1203.

A Delphine, je te suis reconnaissante pour ton accueil chaleureux et ta disponibilité. Merci pour ton aide et ta réactivité pendant la rédaction de mon mémoire.

A Ounissa, tu as été d'une aide précieuse, merci pour tes encouragements et ta disponibilité, ton écoute et ta bienveillance.

A Charlène et Yannick, vos départs ont laissé un vide dans le bureau... Merci Yannick de m'avoir transmis tes connaissances en bioinformatique et en statistiques. Merci Charlène pour nos moments de complicité et pour nos moments passés ensemble.



A Alexe, toi et moi avons formé un duo de choc pour maintenir le navire à flots! Merci d'avoir égayé mes journées au labo. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite et j'espère que nous resterons en contact... pour que je continue de piocher dans ta merveilleuse garde-robe!

A Fatima, merci pour ta disponibilité et ton aide pendant ma rédaction. Je te lègue le bureau qui m'a accueilli pendant trois longues années, mes cahiers de manip et surtout la suite de mon projet, je sais que tu en feras bon usage. Merci pour ta gentillesse.

A l'équipe d'ADV, je ne vous ai pas souvent croisé mais je tiens à remercier tous ceux qui ont agi dans l'ombre pour le bon déroulement de mes projets de thèse : biologistes, technicien(ne)s, internes. Merci aux secrétaires Stéphanie et Stéphanie pour leur bonne humeur, merci à Margaux pour nos sessions de décongélation embryonnaire, merci à Nelly pour la gestion des données clinicobiologiques.

A la plateforme transcriptomique du CHU, et notamment à Véronique Pantesco. Merci pour ta disponibilité et ton efficacité, pour tes conseils et ta gentillesse.

A mes collègues de l'IRMB, vers qui j'ai toujours pu me tourner pour avoir des conseils ou pour un café. A ceux qui sont partis mais qui ont partagé quelques mois ou années avec moi : l'équipe bleue Chloé, Joffrey et Mathieu mais aussi Alexis et Jean (les boutons de ta chemise se souviendront de moi). Merci à Said pour sa bonne humeur. Merci Soledad pour tes compliments quotidiens et tes précieux conseils sur "les 10 façons de filer un collant", notre passion commune pour Promod aura engendré de nombreuses conversations de couloirs. A Micka, pour tes nombreuses histoires de NK, tes recettes aux noms étranges et tes coupes de cheveux, tu as toujours eu le mot pour rire (même si tu radotes un peu). A Hortense, Léa et Lois pour les kebabs partagés. A Pauline pour tes précieux conseils et nos discussions au détour d'un couloir. A Emilie, toujours partante pour un apéro!

A mes collègues de l'institut devenues mes amies pour la vie, mes p'tites grosses d'amour. Elena, depuis 3 ans, je crois qu'il ne s'est pas écoulé 2 jours sans qu'on échange par sms, whatsapp, snapchat ou messenger, ou parfois tout en même temps (pour le plus grand plaisir de Youri qui a du mal à saisir le concept). Réunies par notre passion pour le chocolat, le GIF café du matin a longtemps été notre routine quotidienne... Ca va me manquer c'est sûr ! Mélanie, je me souviens de notre première discussion comme si c'était hier, tu m'avais dit que je ne pouvais pas te donner mon avis sur ta vie car je ne te connaissais pas. Aujourd'hui, c'est à moi que tu demandes un conseil quand tu en as besoin... Et même si Julien a encore des doutes sur la nature de notre relation (amicale bien sûr!), je trouve que c'est une magnifique progression,

non? Merci à vous de m'avoir soutenue, conseillée et aimée, merci pour nos soirées sushis, raclette, crêpes (ou autre nourriture de p'tite grosse) sans oublier le mojito! Vous m'avez convertie au Sud même si je garde mon accent parisien... Donc vous allez encore devoir vous coltiner un petit boulet pendant de longues années! Même si nous ne nous croiserons plus dans les couloirs (tristesse infinie), le Casa Cubana sera là pour continuer à être notre QG! A Marie, nouvellement nommée petite grosse, tu es une très belle rencontre. Toujours souriante et bienveillante, c'était particulièrement agréable de te croiser dans le couloir et de recevoir un petit clin d'œil charmeur ! Encore merci les filles d'être de si bonnes amies au quotidien !

A mes amies parisiennes, Juliette et Mélanie. Ma copine d'amour, merci de m'avoir soutenue pendant ma thèse, toujours partante pour aller bruncher ou faire un tea-time dans un coin parisien quand je remonte le temps d'un week-end... Je peux toujours compter sur toi dans les bons comme les mauvais moments.

A mes parents et ma sœur, même si vous êtes loin, il ne se passe pas un jour sans que je pense à vous. Vous avez été présents dans les moments difficiles comme dans les bons et avez su me soutenir pour que je sorte la tête de l'eau quand c'était nécessaire. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui ! Merci de toujours croire en moi.

A mon amour, merci d'être mon pilier depuis 7 ans, merci pour ton soutien et tes encouragements chaque jour de ma vie.

# Table des matières

Remerciements .....	1
Table des matières .....	4
Table des figures .....	7
Table des tableaux .....	9
Abréviations .....	10
INTRODUCTION.....	13
Chapitre 1 : l'infertilité .....	14
I. Infertilité masculine .....	14
A. Généralités .....	14
B. Causes d'infertilité.....	15
II. Infertilité féminine.....	16
A. Généralités .....	16
B. Causes d'infertilité.....	17
1. Impact de l'âge maternel .....	17
2. Diminution de la réserve ovarienne .....	18
3. Dysfonction ovulatoire .....	18
4. Facteurs tubaires .....	19
5. Facteurs utérins .....	19
III. Infertilité idiopathique.....	19
Chapitre 2 : Les techniques d'assistance médicale à la procréation.....	20
I. Insémination Intra Utérine.....	20
II. Fécondation <i>In Vitro</i> .....	20
A. Stimulation ovarienne.....	20
B. FIV et culture embryonnaire.....	24
1. Mise en fécondation : conventionnelle/ICSI .....	24
2. Culture embryonnaire .....	24
C. Stratégie de transfert embryonnaire.....	30
1. Le jour de transfert : principalement J3 et J5 .....	30
2. Transfert frais .....	31
3. Transfert d'embryon(s) congelé(s) .....	31
III. Les résultats en AMP .....	32
A. Les issues de tentatives en AMP .....	32

B. Résultats en France .....	33
Chapitre 3 : Embryon-endomètre : un dialogue difficile.....	34
I. Facteurs impactant les résultats .....	34
A. Facteurs impactant la fertilité féminine.....	34
B. Facteurs impactant le potentiel implantatoire embryonnaire .....	35
II. Optimiser la synchronisation embryo-maternelle .....	36
A. Physiologie : synchronisation entre le blastocyste en développement et l’endomètre réceptif.....	36
1. Développement du blastocyste .....	36
2. Apposition .....	37
3. Adhésion.....	37
4. Invasion .....	38
B. Nouveaux outils d’évaluation de la réceptivité endométriale .....	39
1. Décidualisation et Fenêtre implantatoire.....	39
2. Evaluation de la réceptivité en AMP (Baron <i>et al.</i> , 2021) .....	43
C. Amélioration de la compétence embryonnaire.....	56
 RÉSULTATS .....	 59
Chapitre 1 : Nouveaux biomarqueurs d’évaluation de la réceptivité endométriale .....	60
I. Contexte et présentation de la publication.....	60
II. Article 1 (Drissenek <i>et al.</i> , 2020) .....	60
Endometrial miRNome profile according to the receptivity status and implantation failure	
III. Résumé des résultats .....	78
Chapitre 2 : Contribution à la compréhension de la compétence embryonnaire.....	80
I. Contexte et présentation de la publication.....	80
II. Article 2 (Brouillet <i>et al.</i> , sous presse).....	80
Biphasic (5%-2%) oxygen concentration strategy significantly improves the usable blastocyst and cumulative live birth rates in in vitro fertilization	
III. Résumé des résultats .....	114
 DISCUSSION .....	 116
I. Les miRNA, biomarqueurs de la réceptivité endométriale .....	117
A. Les miRNA endométriaux associés au statut de la réceptivité endométriale.....	117
B. Les miRNA endométriaux associés aux résultats des tentatives.....	120
C. Les miRNA circulants .....	124

D. Conclusion.....	125
II. Concentration en oxygène <i>in vitro</i> et compétence embryonnaire .....	126
A. La stratégie séquentielle améliore les taux de succès en FIV .....	126
1. Hypothèse 1 : La stratégie séquentielle diminue l'exposition embryonnaire aux espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	127
2. Hypothèse 2 : La stratégie séquentielle régule des gènes impliqués dans le développement et l'implantation embryonnaire .....	128
B. La stratégie séquentielle entraîne une activation transcriptomique embryonnaire. ....	129
1. Les voies de signalisation modulées par la stratégie séquentielle .....	130
2. Recherche de nouveaux marqueurs de la compétence embryonnaire .....	131
3. Comparaison avec les autres études .....	133
C. Perspectives .....	133
D. Conclusion.....	134
 CONCLUSION GENERALE .....	 136
 Bibliographie.....	 138
 Annexe .....	 151
Annexe 1 : Etude de faisabilité sur une cohorte embryonnaire indépendante.....	151
 ABSTRACT .....	 155
RÉSUMÉ.....	156

# Table des figures

FIGURE 1 LA REPRODUCTION MASCULINE .....	15
FIGURE 2 LES CAUSES D'INFERTILITE FEMININE.....	17
FIGURE 3 CONTROLE HORMONAL PHYSIOLOGIQUE DU CYCLE MENSTRUEL ET PRINCIPE DU TRAITEMENT DE LA STIMULATION OVARIENNE EN FECONDATION IN VITRO .....	21
FIGURE 4 REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN FOLLICULE SECONDAIRE ANTRAL.....	23
FIGURE 5 PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DE FIV : DE LA PONCTION AU TRANSFERT EMBRYONNAIRE. ...	25
FIGURE 6 CULTURE EMBRYONNAIRE, VISUALISATION DES PRONOYEAUX .....	26
FIGURE 7 CULTURE EMBRYONNAIRE ET CLASSIFICATION DE BLEFCO. ....	26
FIGURE 8 CULTURE EMBRYONNAIRE, REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU BLASTOCYSTE ET CLASSIFICATION .....	28
FIGURE 9 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES FACTEURS DE STRESS INTERNES DANS LES LABORATOIRES DE FECONDATION IN VITRO.....	30
FIGURE 10 SYNCHRONISATION DU STADE EMBRYONNAIRE AVEC LA PREPARATION ENDOMETRIALE..	32
FIGURE 11 PROGRESSION DE L'EMBRYON PREIMPLANTATOIRE HUMAIN EN DEVELOPPEMENT DEPUIS SA FECONDATION DANS LA TROMPE DE FALLOPE A LA CAVITE UTERINE. ....	37
FIGURE 12 LES 3 ETAPES DE L'IMPLANTATION EMBRYONNAIRE : APPPOSITION, ADHESION ET INVASION .....	38
FIGURE 13 INVASION DE L'ENDOMETRE PAR LE BLASTOCYSTE ET DIFFERENCIATION DES CELLULES DU TROPHECTODERME ET DE LA MASSE CELLULAIRE INTERNE .....	39
FIGURE 14 LE CYCLE MENSTRUEL ENDOMETRIAL .....	40

FIGURE 15 MODIFICATION ENDOMETRIALES PENDANT LA FENETRE IMPLANTATOIRE.....	42
FIGURE 16 MECANISME DE SYNTHÈSE DES miRNA .....	55
FIGURE 17 DESIGN ET PRINCIPAUX RESULTATS DES ETUDES COMPARANT LA CULTURE MONOPHASIQUE (5%) A LA CULTURE SEQUENTIELLE (5-2%) EN OXYGENE PENDANT LA CULTURE EMBRYONNAIRE PROLONGEE.....	57
FIGURE 18 ANALYSE FONCTIONNELLE INGENUITY® DES miRNA ENDOMETRIAUX ASSOCIES AUX ECHECS D'IMPLANTATION .....	122
FIGURE 19 ANALYSE FONCTIONNELLE INGENUITY® DES miRNA ENDOMETRIAUX ASSOCIES AUX FAUSSES COUCHES.....	123
FIGURE 20 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES POTENTIELS MECANISMES IMPACTES PAR LA STRATEGIE SEQUENTIELLE (5-2%) EN OXYGENE POUVANT EXPLIQUER LES RESULTATS CLINIQUES OBTENUS.....	130
FIGURE 21 QUANTIFICATION RELATIVE PAR LA FORMULE $2^{-\Delta\Delta Ct}$ DE 5 mRNA PAR RT-QPCR. ....	154

# Table des tableaux

TABLEAU 1 VALEUR DE REFERENCE DU SPERMOGRAMME ET PATHOLOGIES ASSOCIEES AUX ANOMALIES.....	16
TABLEAU 2 LISTE NON EXHAUSTIVE DES TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES UTILISES DANS LE CADRE DE LA FIV .....	22
TABLEAU 3 RECAPITULATIF SOMMAIRE DES ETUDES COMPARANT LES STRATEGIES MONOPHASIQUE (5%) ET SEQUENTIELLE (5-2%) D'OXYGENE PENDANT LA CULTURE PROLONGEE D'EMBRYONS HUMAINS.....	58



# Abréviations

ABM : Agence de la BioMédecine

AGER : advanced glycosylation end-product specific receptor

Ago : protéines argonaute

AJUBA : Ajuba LIM Protein

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMH : hormone antimüllérienne

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

ATP : Adénosine Triphosphate

BAX : Bcl2 Associated X protein

CCO : complexes cumulo-ovocytaires

CFA : compte des follicules antraux

COX2 : cyclooxygenase 2

CTCF : CCCTC-Binding Factor

CX43 : Connexin 43

DMXL2 : dmx like 2

EP400 : E1A Binding Protein P400

FIV(c) : fécondation *in vitro* (conventionnelle)

FIV ICSI : FIV assistée par micro-injection de spermatozoïdes (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)

FLCN : folliculin

FSH : Hormone Folliculostimulante

GLUT : Transporteur de Glucose

GNA12 : G Protein Subunit Alpha 12

GnRH : Gonadotrophin Releasing Hormone

G6PD : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase

hCG : gonadotrophine chorionique humaine

hESC : cellules souches embryonnaires humaines

HIF : facteurs induits par l'hypoxie (hypoxia inducible factors)

HIG2 : hypoxia-inducible protein 2

HIGD2A : HIG1 hypoxia inducible domain family, member 2A

HILPDA : hypoxia inducible lipid droplet associated

HRE : éléments de réponse à l'hypoxie  
IIU : insémination intra-utérine  
IL6 : interleukine 6  
IMC : Indice de Masse Corporel  
KIF22 : kinesin family member 22  
LH : Hormone Lutéinisante  
LIF : facteur inhibiteur de leucémie  
MALT1 : MALT1 paracaspase  
MAP2K4 : mitogen-activated protein kinase 4  
MCI : Masse Cellulaire Interne  
MEC : Matrice ExtraCellulaire  
miRNA : micro Acides Ribonucléiques  
MMP : métalloprotéinase matricielles  
MnSOD : Manganese superoxide dismutase  
mRNA : Acides Ribonucléiques messagers  
NANOG : nanog homeobox  
OCT4 : octamer-binding transcription factor 4  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
OPN : ostéopontine  
OTUD6B : OTU Deubiquitinase 6B  
PN : pronoyaux  
POLB : DNA Polymerase Beta  
POLD1 : DNA polymerase delta 1  
POMT2 : protein O-mannosyltransferase 2  
PPARGC1A : PPARG coactivator 1 alpha  
PROK1 : prokinéticine 1  
RIF : Repeated Implantation Failure ou échec d'implantation répétés  
ROS : espèces réactives de l'oxygène  
RRM1 : Ribonucleotide Reductase Catalytic Subunit M1  
RT-qPCR : reverse-transcriptase suivie d'une réaction en chaîne par polymérase quantitative  
SHSO : syndrome d'hyperstimulation ovarienne  
SNAP23 : synaptosomal-associated protein 23

SOPK : syndrome des ovaires polykystiques

SOX2 : SRY-Box Transcription factor 2

STK3 : serine/threonine kinase 3

TAF12 : TATA-Box Binding Protein Associated Factor 12

TEC : transferts d'embryons congelés

TE : trophoctoderme

TEFM : transcription elongation factor, mitochondrial

THOC1 : THO complex 1

TIGAR : TP53 Induced Glycolysis Regulatory Phosphatase

uNK : uterine natural killer

WHO : World Health Organization

# INTRODUCTION

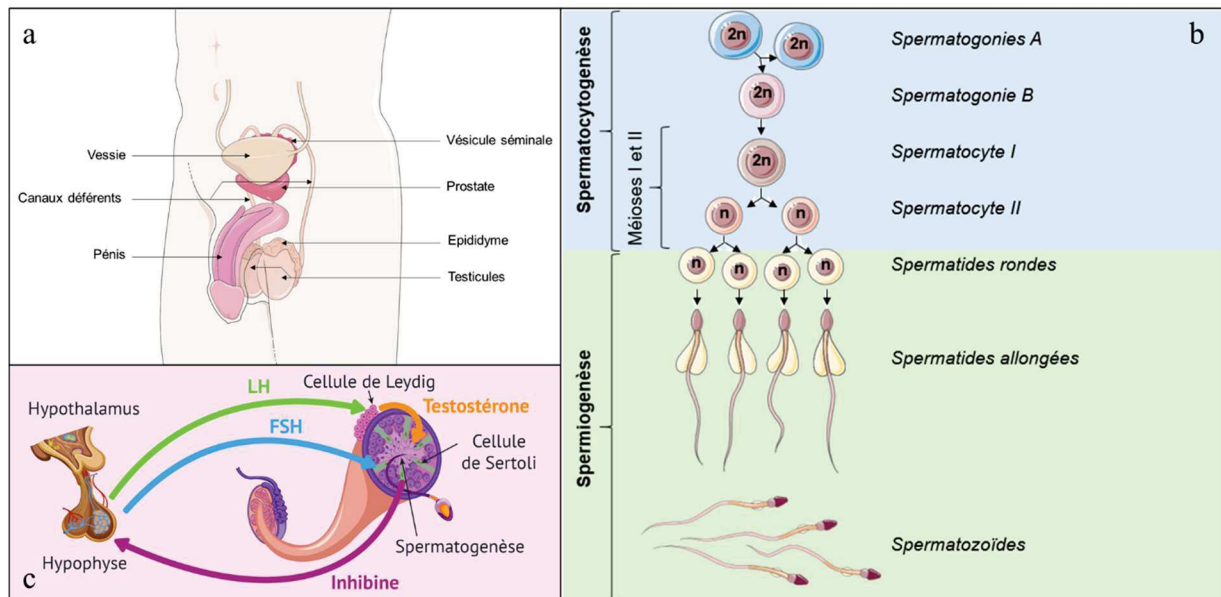
# Chapitre 1 : l'infertilité

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ou World Health Organization (WHO) définit l'infertilité par l'absence de grossesse après au moins un an de rapports sexuels réguliers non protégés chez les couples en âge de procréer (Mascarenhas *et al.*, 2012; Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Elle affecte environ 15% des couples en âge de procréer (Salas-Huetos *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2019), représentant 50 millions de couples infertiles à travers le monde (Mascarenhas *et al.*, 2012). Dans 75% des cas, cette infertilité peut être expliquée par un facteur masculin (20 à 30%), féminin (20 à 30%) ou mixte (environ 30%) (Choy and Eisenberg, 2018; Salas-Huetos *et al.*, 2017). Dans 25% des cas, aucune cause d'infertilité n'est trouvée, on parle alors d'infertilité inexpliquée ou idiopathique (Wang *et al.*, 2019).

## I. Infertilité masculine

### A. Généralités

Un homme est considéré fertile s'il a initié au moins une grossesse clinique avec ses propres gamètes avec une partenaire (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). La fertilité masculine débute à la puberté et est généralement maintenue tout au long de la vie de l'individu. Elle dépend de l'anatomie du tractus génital et de sa capacité à émettre des spermatozoïdes fonctionnels à l'intérieur du vagin. L'appareil reproducteur masculin est composé de deux testicules, de voies spermatiques excrétrices (épididymes, canaux déférents et urètre), de glandes annexes (vésicules séminales, prostate et glandes de Cowper) et du pénis (*Figure 1a*). La spermatogenèse se déroule dans les tubes séminifères des testicules. Elle est soutenue par les cellules de Sertoli (Santi *et al.*, 2020). Elle comprend trois étapes successives permettant les étapes de différenciation des spermatogonies en spermatocytes, puis spermatides rondes (méioses 1 et 2), et enfin en spermatozoïdes (*Figure 1b*) (Griswold, 2016). Ceux-ci sont alors libérés dans la lumière des tubes séminifères lors de l'étape de spermiation puis ils subissent une étape de maturation épидидymaire leur permettant d'acquérir leur mobilité et leur pouvoir fécondant (Verze *et al.*, 2016). La spermatogenèse est régulée par les gonadotrophines hypophysaire : l'Hormone Folliculostimulante (FSH) et l'Hormone Lutéinisante (LH) (Santi *et al.*, 2020) (*Figure 1c*).



**Figure 1 La reproduction masculine.** a Anatomie de l'appareil reproducteur masculin. Il est composé de deux testicules, de voies spermatiques excrétrices (épididyme, canaux déférents), de glandes annexes (vésicule séminale, prostate) et du pénis. b Etapes de la spermatogénèse. Elle se déroule dans les tubes séminifères des testicules et permet la différenciation des spermatogonies souches en spermatozoïdes. ; c Contrôle hormonal de la fonction reproductive masculine (à partir de [invitra.fr](http://invitra.fr)). La LH, produite par l'hypophyse, agit sur les cellules de Leydig pour activer la sécrétion de testostérone. A son tour, la testostérone ainsi que la FSH produite par l'hypophyse, régulent la spermatogénèse dans les tubes séminifères.

LH : hormone lutéinisante ; FSH : hormone folliculostimulante

## B. Causes d'infertilité

L'évaluation de la fertilité masculine inclut un interrogatoire médical ainsi qu'une analyse de sperme (appelée spermogramme), dont les valeurs de référence ont été établies en 2010 par l'OMS (*Tableau 1*). L'infertilité masculine peut résulter d'une diminution de la numération spermatique (oligozoospermie), de la mobilité spermatique (asthénozoospermie), de la morphologie spermatique (térazoospermie) et/ou de la vitalité spermatique (nécrospermie) (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). L'azoospermie correspond à une absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat (Rumbold *et al.*, 2019).

Paramètre (unité)	Valeur référence (limite inférieure)	Pathologie associée (paramètre sous le seuil référence)
Volume (ml)	1,5	hypospermie
pH	$\geq 7,2$	pH acide
Concentration spermatique (10 <sup>6</sup> /ml)	15	oligozoospermie
Nombre total de spermatozoïdes (10 <sup>6</sup> /éjaculat)	39	oligozoospermie
Mobilité totale (%)	40	asthénozoospermie
Mobilité progressive (%)	32	asthénozoospermie
Morphologie des spermatozoïdes (forme normale, %)	4% minimum de spermatozoïdes de forme normale selon l'OMS Critères stricts de Kruger : excellent pronostic (>14% de morphologie normale), bon pronostic (4-14%) et faible pronostic (<4%)	tératozoospermie
Vitalité des spermatozoïdes	58%	Nécrozoospermie

**Tableau 1 Valeur de référence du spermogramme et pathologies associées aux anomalies.** (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2015b ; WHO 2010)

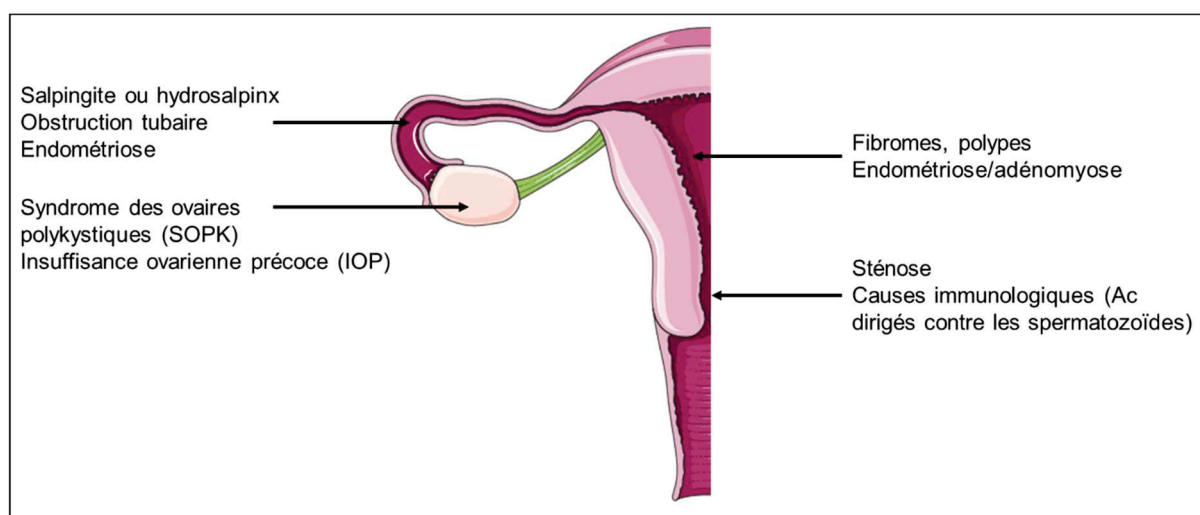
## II. Infertilité féminine

### A. Généralités

La fertilité féminine est définie par la capacité pour une femme à obtenir une grossesse clinique avec ses propres gamètes (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). La période de fertilité d'une femme s'étend de la puberté jusqu'à la ménopause, avec un déclin rapide des chances de grossesse à partir de 35 ans (Fritz and Jindal, 2018). La fertilité féminine dépend de nombreux facteurs comme l'anatomie du tractus féminin, la présence de cycles menstruels fonctionnels et la compétence ovocytaire.

## B. Causes d'infertilité

Les causes d'infertilité féminine peuvent être la détérioration de la qualité ovocytaire majoritairement associée à l'augmentation de l'âge maternel, les troubles de l'ovulation (dont le syndrome des ovaires polykystiques ou SOPK), l'inflammation des trompes (qui peut être causée par une infection par *Chlamydiae trachomatis* par exemple), l'endométriose ou les anomalies de la cavité utérine qui peuvent interférer avec l'implantation embryonnaire (Expert Panel on Women's Imaging *et al.*, 2020) (Figure 2). Le terme de réserve ovarienne est traditionnellement utilisé pour évaluer indirectement le potentiel reproducteur d'une femme (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2020). Malgré l'utilisation de plusieurs marqueurs de réserve ovarienne, l'âge de la femme reste un critère majeur pour évaluer les chances de grossesse (Fritz and Jindal, 2018).



**Figure 2 Les causes d'infertilité féminine.** Liste des causes majeures de dysfonction ovulatoire, tubaire et des facteurs utérins pouvant engendrer une infertilité chez la femme. Ac : anticorps

### 1. Impact de l'âge maternel

L'âge moyen des mères lors de leurs accouchements en France a augmenté ces 25 dernières années : alors qu'il était de 28.8 ans en 1994 il est de 30.8 ans en 2020 (Insee, 29 mars 2021). Les taux de grossesse après 12 cycles menstruels chez des femmes âgées de 30 à 35 ans sont stables à 82-88% puis diminuent à 71-76% entre 36 et 39 ans pour atteindre 48-54% entre 40 et 44 ans (Fritz and Jindal, 2018). Le déclin de la réserve ovarienne d'une femme avec le temps est à ce jour irréversible (Tal and Seifer, 2017). Les patientes les plus âgées auront de plus en



plus de difficultés à concevoir, ce qui peut entraîner une demande accrue aux techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP).

## 2. Diminution de la réserve ovarienne

La réserve ovarienne est évaluée grâce à deux marqueurs de référence :

- Le dosage sanguin de l'hormone antimüllérienne (AMH) est un marqueur indirect du nombre de follicules ovariens pré-antraux et petits antraux (Dewailly *et al.*, 2014; Tal and Seifer, 2017). Elle est sécrétée par les cellules de la granulosa de ces follicules. L'AMH est utilisée comme facteur prédictif de la réponse ovarienne dans le cadre d'un traitement de stimulation en AMP, permettant ainsi aux cliniciens d'adapter les doses de traitements à chaque patiente. Cependant, son dosage n'est pas toujours prédictif de la qualité des ovocytes, c'est-à-dire de leur potentiel à donner une grossesse (Tal and Seifer, 2017; Umarsingh *et al.*, 2020) ou une naissance vivante (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2020).

- Le compte des follicules antraux (ou CFA), réalisé par échographie endovaginale au début de la phase folliculaire (vers jour 3 (J3) du cycle menstruel), correspond à la somme des follicules mesurant entre 2 et 10 mm (Tal and Seifer, 2017). Un CFA compris entre 9 et 19 est généralement associé à une bonne réponse à la stimulation ovarienne (Coelho Neto *et al.*, 2018). En revanche, il n'est pas toujours associé aux chances de grossesse et de naissance vivante de la patiente (Broer *et al.*, 2009; Mutlu *et al.*, 2013; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2020; Sahmay *et al.*, 2012).

Ces deux marqueurs sont inversement proportionnels à l'âge des femmes, fertiles ou infertiles (Khan *et al.*, 2019; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2020). La concentration en AMH diminue de 6% et le CFA de 4.5% par an (Khan *et al.*, 2019).

## 3. Dysfonction ovulatoire

La présence de cycles menstruels réguliers d'une durée normale (entre 21-35 jours) est en général en faveur d'un fonctionnement ovarien (Prior *et al.*, 2015). Cependant, jusqu'à un tiers des femmes avec des cycles menstruels réguliers de 28 jours n'ovulent pas (Infertility Workup for the Women's Health Specialist: ACOG Committee Opinion, Number 781, 2019; Prior *et al.*, 2015). Le dysfonctionnement ovulatoire est responsable de l'infertilité du couple dans 15% des cas (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2015a).

#### 4. Facteurs tubaires

Les facteurs tubaires participent à l'infertilité de couple dans environ 15% des cas (Expert Panel on Women's Imaging *et al.*, 2020). Les hydrosalpinx, correspondant à une rétention liquidienne dans une trompe, représentent 10 à 30% des cas d'infertilité tubaire (Ng and Cheong, 2019).

#### 5. Facteurs utérins

Parmi les pathologies pouvant altérer la réceptivité endométriale, on retrouve l'endométriose, l'adénomyose ou encore les fibromes. L'endométriose est caractérisée par du tissu endométrial ectopique (Missmer *et al.*, 2004). On estime qu'elle affecte 5 à 10% de la population féminine en âge de procréer et plus d'un tiers des femmes infertiles (Expert Panel on Women's Imaging *et al.*, 2020). L'adénomyose est définie par la présence de tissu endométrial au sein du myomètre (Bergeron *et al.*, 2006). Les fibromes ou myomes utérins sont des lésions bénignes de l'utérus, composées de cellules musculaires lisses, de fibroblastes et de matrice extracellulaire, pouvant gêner l'implantation embryonnaire (Stewart *et al.*, 2016).

### III. Infertilité idiopathique

En cas d'infertilité idiopathique ou inexplicée, les examens dits « de routine » n'ont pas permis d'identifier la ou les causes de l'infertilité (Wang *et al.*, 2019). De nombreux paramètres pouvant affecter la fertilité des individus sont encore inconnus. La recherche clinique permet d'identifier de nouvelles causes d'infertilité (notamment des causes génétiques) et d'évaluer l'intérêt de nouveaux tests diagnostiques ou pronostiques dans la prise en charge des couples infertiles.

## Chapitre 2 : Les techniques d'assistance médicale à la procréation

Parmi les couples infertiles, environ la moitié ont recours à l'AMP pour concevoir (Ledger, 2009). Trois techniques d'AMP peuvent être proposées aux couples infertiles : l'insémination intra-utérine (IIU), la fécondation *in vitro* (FIV) conventionnelle (FIVc), ou la FIV assistée par micro-injection de spermatozoïdes (Intracytoplasmic Sperm Injection ou ICSI). En 2019, 157 593 tentatives d'AMP ont été réalisées en France, dont 30% d'IIU et 70% de FIV (19% en FIVc, 39% en ICSI et 42% de transferts d'embryons congelés (TEC)) (Rapport Médical et Scientifique 2020, Agence de la BioMédecine (ABM)).

### I. Insémination Intra Utérine

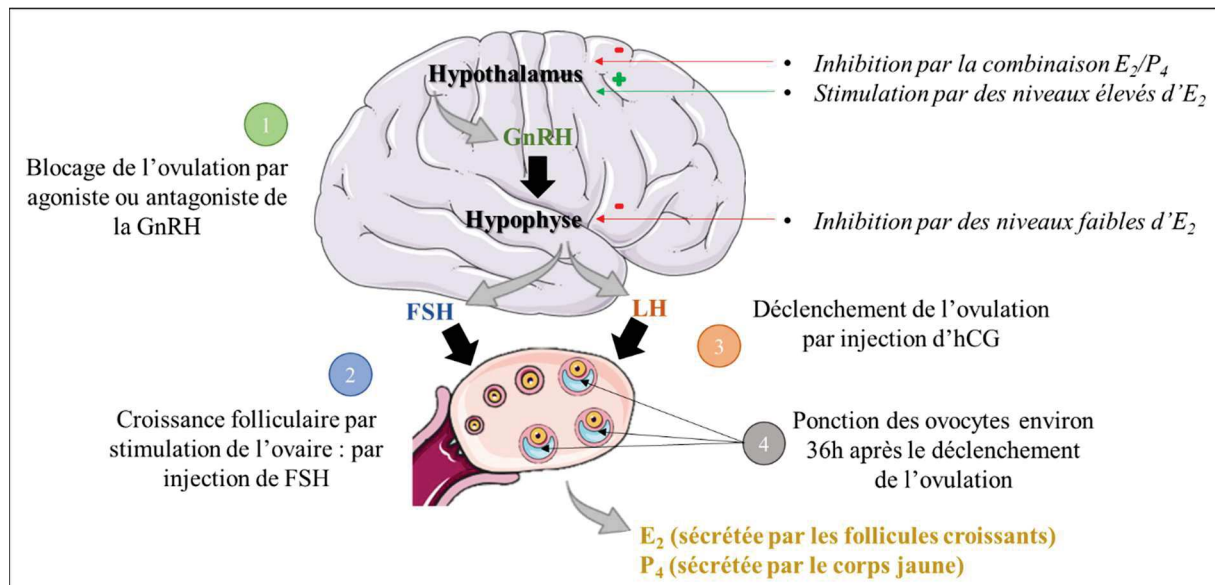
L'IIU est une méthode simple et peu invasive. C'est la technique la plus utilisée à travers le monde (Cohlen *et al.*, 2018). Cette technique est majoritairement indiquée en cas d'infertilité masculine modérée ou d'infertilité inexplicée (Cohlen *et al.*, 2018). Elle consiste à déposer une préparation enrichie en spermatozoïdes mobiles directement dans la cavité utérine (Lemmens *et al.*, 2017).

### II. Fécondation *In Vitro*

La FIV repose sur une première étape de stimulation ovarienne plurifolliculaire, suivie d'une ponction ovarienne et de la mise en fécondation *in vitro* des ovocytes matures récupérés avec les spermatozoïdes. Après la mise en fécondation, les ovocytes sont mis en culture et observés chaque jour jusqu'au transfert éventuel d'un ou plusieurs embryon(s) dans la cavité utérine. La FIV est parfois associée à la congélation des embryons surnuméraires (correspondant aux embryons de scores morphocinétiques satisfaisants mais non transférés en frais) pour un transfert ultérieur.

#### A. Stimulation ovarienne

Physiologiquement, l'hypothalamus sécrète de manière pulsatile l'hormone Gonadolibérine (Gonadotrophin Releasing Hormone ou GnRH) dans la circulation porte hypothalamo-hypophysaire. En se liant à son récepteur hypophysaire, la GnRH entraîne la libération des glycoprotéines FSH et LH par l'adénohypophyse dans la circulation générale. Chez la femme, FSH et LH participent à la croissance folliculaire, la maturation folliculaire et l'ovulation, ainsi qu'à la sécrétion des hormones stéroïdes sexuelles au niveau des ovaires (œstrogènes et progestérone). Il existe un phénomène de rétrocontrôle négatif par ces deux hormones qui permet de réguler la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus (*Figure 3*).



**Figure 3 Contrôle hormonal physiologique du cycle menstruel et principe du traitement de la stimulation ovarienne en Fécondation In Vitro.** Physiologiquement, la GnRH entraîne la libération hypophysaire de LH et FSH, permettant la libération ovarienne des hormones stéroïdiennes. Ce processus est modulé au cours du cycle menstruel par des phénomènes de rétrocontrôles positifs et négatifs. La stimulation ovarienne est constituée de 4 étapes successives permettant d'abord de bloquer l'ovulation naturelle, puis de stimuler l'ovaire pour obtenir la croissance simultanée de plusieurs follicules, de déclencher l'ovulation dans le but de ponctionner les follicules. GnRH : hormone gonadolibérine ; FSH : hormone folliculo-stimulante ; LH : hormone lutéinisante

La stimulation ovarienne en FIV consiste à :

1) Bloquer l'ovulation naturelle grâce à l'administration d'agonistes ou antagonistes de la GnRH (*Figure 3 et tableau 2*) (Ovarian Stimulation *et al.*, 2020). Ils se fixent tous les deux au niveau des récepteurs de la GnRH hypophysaires. Alors que les agonistes provoquent une phase de stimulation suivie d'une étape de sensibilisation qui permet alors une mise au repos de l'hypophyse par une boucle de rétrocontrôle négatif ; les antagonistes inhibent directement de façon concurrentielle les récepteurs hypophysaires et bloquent les sécrétions de gonadotrophines (Farquhar *et al.*, 2019).

2) Induire le développement de plusieurs follicules ovariens simultanément par l'administration de gonadotrophines exogènes (Farquhar *et al.*, 2019) (*Figure 3* et *tableau 2*). Plusieurs protocoles de stimulation sont disponibles. Ils reposent tous sur l'administration de FSH potentiellement combinée à de la LH.

3) Déclencher l'ovulation par une injection unique de gonadotrophine chorionique humaine (hCG), synthétique ou urinaire (Farquhar *et al.*, 2019) (*Figure 3* et *tableau 2*). Cette injection mime le pic de LH déclencheur de l'ovulation et est essentielle pour l'étape de maturation finale de l'ovocyte, nécessaire à la fécondation.

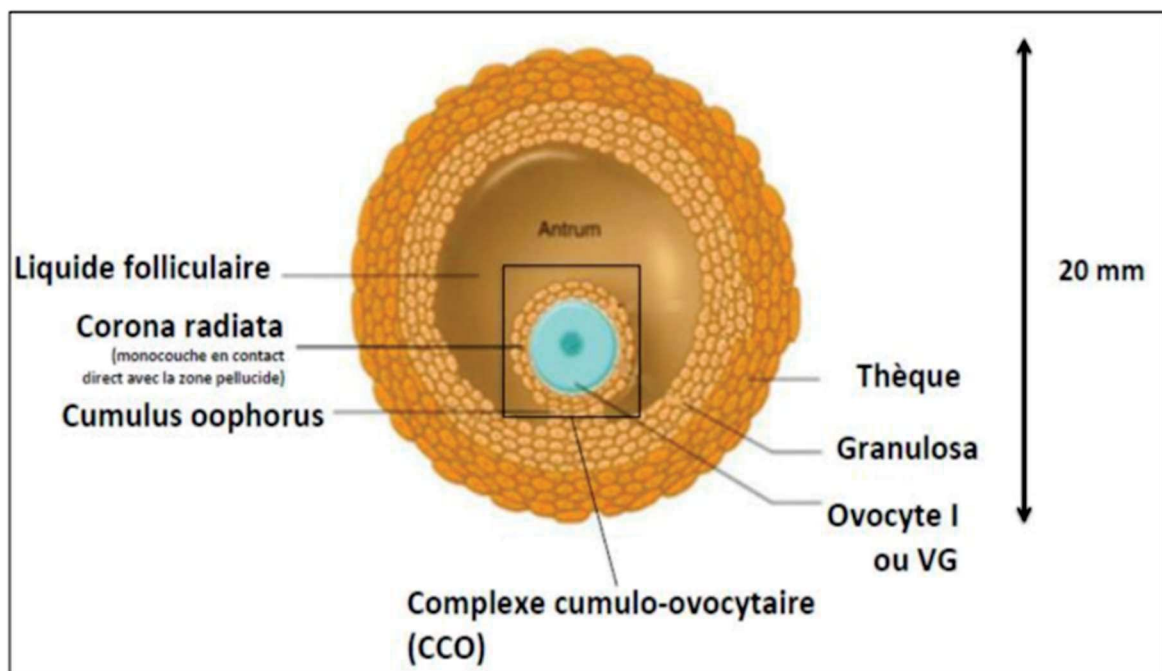
Action	Origine	Nom commercial	Substance active	Activité hormonale
Bloquer la réponse à la GnRH	Antagoniste GnRH (blocage des récepteurs)	Orgalutran®	Ganirelix	GnRH
	Agoniste GnRH (effet flare up)	Décapeptyl®	Triptorénile	
Stimuler la croissance folliculaire	Humaine purifiée	Menopur®	Gonadotrophine humaine ménopausale	FSH + LH (1/1)
	Recombinante	Puregon®	Follitropine β	FSH
		Gonal F®	Follitropine α	
Humaine purifiée	Fostimon®	Urofollitropine		
Déclencher l'ovulation	Recombinante	Ovitrelle®	Choriogonadotrophine α	LH (hCG)
	Humaine purifiée	Gonadotrophin chorionique endo®	Gonadotrophine chorionique	

**Tableau 2 Liste non exhaustive des traitements pharmacologiques utilisés dans le cadre de la FIV** (Construite à partir de [theriaque.org](http://theriaque.org)). GnRH : hormone gonadolibérine ; FSH : hormone folliculo-stimulante ; LH : hormone lutéinisante ; hCG : gonadotrophine chorionique humaine ; FIV : Fécondation In Vitro

Pendant la stimulation, la croissance folliculaire est suivie toutes les 48 heures environ par échographie endovaginale avec ou sans dosage hormonal (LH, estradiol et progestérone). Seuls les follicules antraux sont observables dans les ovaires et peuvent être mesurés. En effet, à ce stade, une cavité s'est formée au sein des follicules : l'antrum, qui est rempli de liquide

folliculaire et qui contient l'ovocyte en croissance (*Figure 4*). L'épaisseur de l'endomètre est également mesurée par échographie.

Les follicules sont ponctionnés au bloc opératoire 36 heures après le déclenchement (*Figure 3*). La ponction consiste à aspirer le liquide folliculaire contenant les complexes cumulo-ovocytaires (CCO) en suspension grâce à une sonde d'échographie endovaginale munie d'une aiguille (*Figure 4*).



**Figure 4 Représentation schématique d'un follicule secondaire antral.** Le follicule secondaire antral est composé d'un ovocyte primaire, entouré de cellules de la corona radiata, formant ensemble le complexe cumulo-ovocytaire (CCO). Le CCO est entouré de la cavité antrale remplie de liquide folliculaire, visualisable à l'échographie, elle-même entourée de cellules de la granulosa et de cellules de la thèque. CCO : complexe cumulo-ovocytaire ; VG : vésicule germinale (adapté de <https://www.centromedicomanzanera.com/puncion-follicular/>)

## B. FIV et culture embryonnaire

### 1. Mise en fécondation : conventionnelle/ICSI

A la suite de la récupération des CCO, les ovocytes sont fécondés par une technique de FIVc ou par ICSI (*Figure 5*). L'ICSI, initialement indiquée pour les formes les plus sévères d'infertilité masculine, est désormais la technique la plus utilisée dans le monde (Esteves *et al.*, 2018).

La FIVc consiste à mettre en contact *in vitro* des spermatozoïdes mobiles autour de chaque CCO. La fécondation a lieu spontanément en  $17 \pm 1$  heures environ (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). En cas d'ICSI, une étape de décoronisation est nécessaire pour débarrasser l'ovocyte des cellules du cumulus, et est suivie de l'injection d'un spermatozoïde dans le cytoplasme de chaque ovocyte mature à l'aide d'une micropipette.

### 2. Culture embryonnaire

#### i) Du zygote au stade clivé (J0 à J3)

Les ovocytes fécondés sont mis en culture *in vitro* et observés chaque jour pour suivre le développement embryonnaire. La culture s'effectue dans un incubateur à 37°C sous 6% de CO<sub>2</sub> pendant 2 à 6 jours.

A  $17 \pm 1$  h post-insémination, une fécondation normale est visualisée grâce à la présence de 2 pronoyaux (PN) à l'intérieur de l'ovocyte (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) (*Figure 6*).

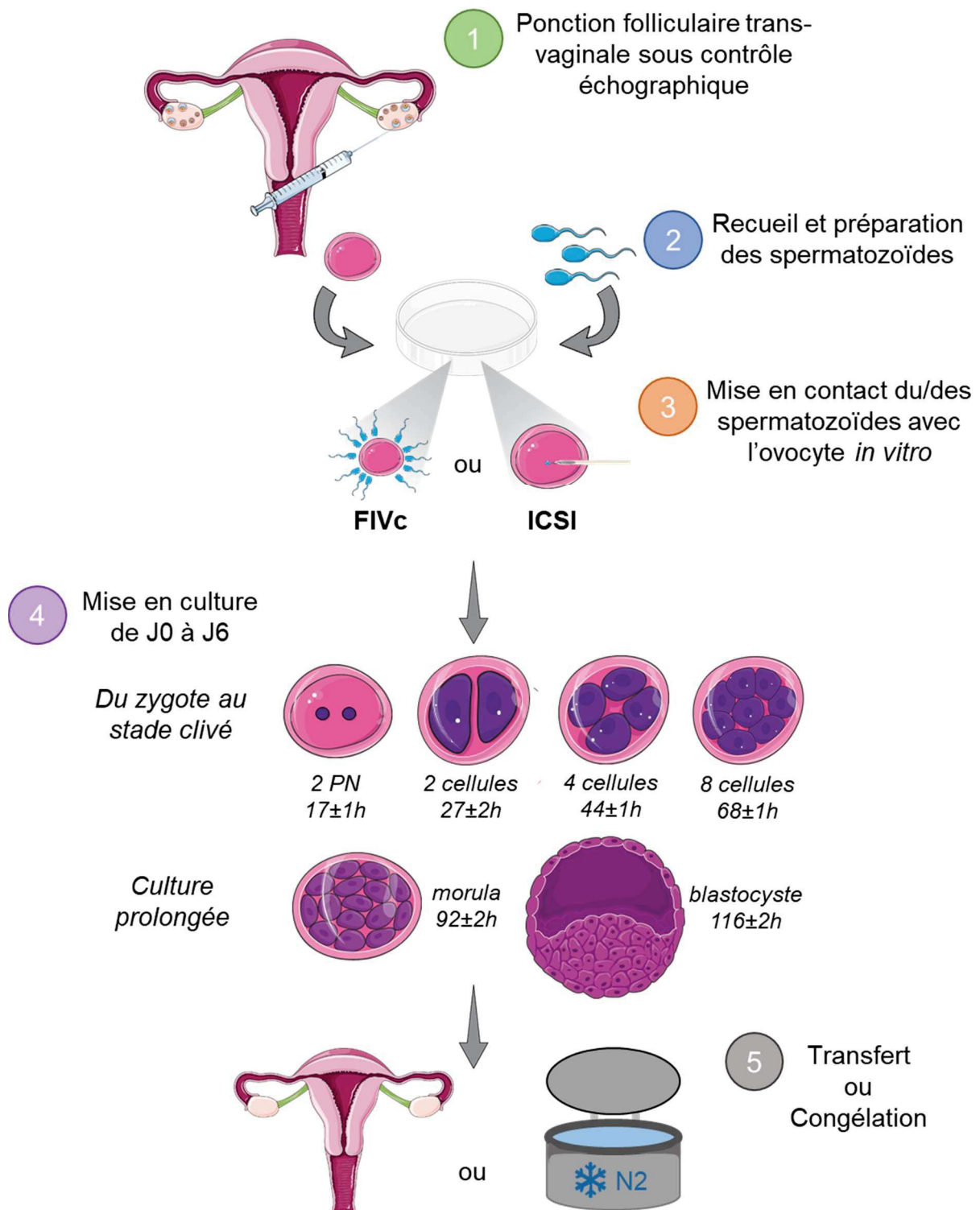
Un embryon doit présenter 4 cellules à  $44 \pm 1$  h (J2) et 8 cellules à  $68 \pm 1$  h (J3) post-insémination, (*Figure 5*) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Au cours du développement de l'embryon préimplantatoire, la classification de la Fédération Nationale des BLEFCO France (Biologistes des Laboratoires d'Etude de la Fécondation et de la Conservation de l'Oeuf) (*Figure 7*) est utilisée pour évaluer la qualité embryonnaire. Elle présente trois chiffres :

1<sup>er</sup> chiffre = nombre de blastomères

2<sup>ème</sup> chiffre = divisions embryonnaires, 1 (typiques) ou 2 (atypiques)

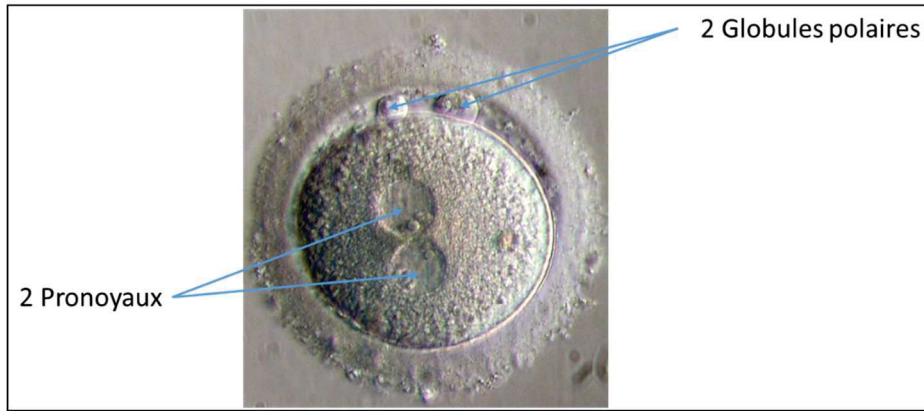
3<sup>ème</sup> chiffre = Taux de fragmentation, reflétant la qualité et la viabilité des embryons : 1, pour légèrement (<10%), 2 pour moyennement (10-50%) et 3 pour sévèrement fragmenté (>50%)



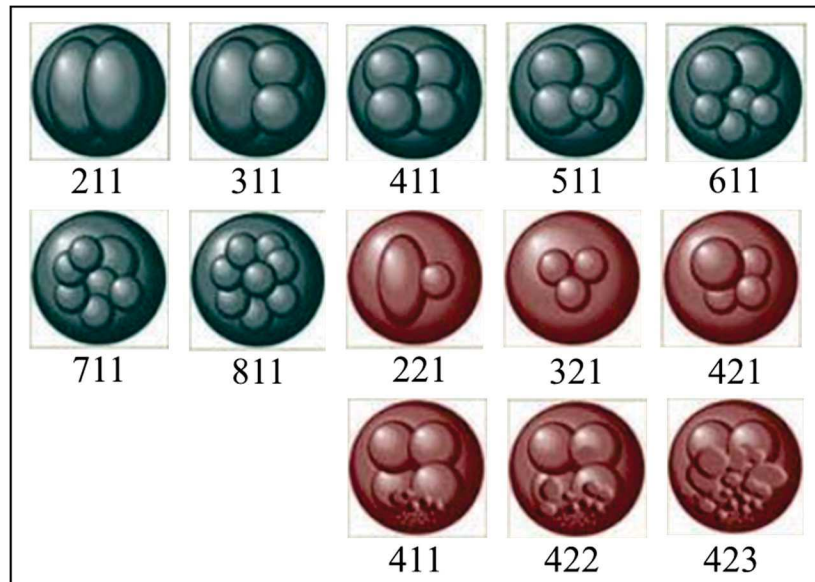


**Figure 5 Principe de la technique de FIV : de la ponction au transfert embryonnaire.** En parallèle au recueil des CCO, les spermatozoïdes sont préparés puis mis en fécondation par FIVc ou ICSI au laboratoire *in vitro*. Les ovocytes fécondés sont alors cultivés avant d'être transférés dans l'utérus ou congelés en vue d'une utilisation ultérieure. FIV(c) : Fécondation in vitro (conventionnelle) ; ICSI : Intracytoplasmic sperm injection ; CCO : complexe cumulo-ovocyttaire ; PN : pronoyaux ; N2 : azote.





**Figure 6 Culture embryonnaire, visualisation des pronoyaux.** Visualisation microscopique d'un ovocyte fécondé qui a expulsé son second globule polaire et dans lequel les pronoyaux mâle et femelle se sont formés. Cette formation témoigne d'une fécondation normale à  $17 \pm 1$  heures post-insémination.



**Figure 7 Culture embryonnaire et classification de Blefco** (d'après blefco.eu). Les 3 chiffres permettent de témoigner du nombre de blastomères (de 2 à 8), du type de division (si les cellules sont de tailles identiques on parle de division typique identifiée 1. A l'inverse, la division est dite atypique et identifiée 2.) et du taux de fragmentation (de 1 à 3).

ii) La culture prolongée jusqu'au stade blastocyste (J3 à J5/6)

La culture peut être prolongée après le 3<sup>ème</sup> jour jusqu'au stade de blastocyste à J5/J6. On observe les premiers signes de compaction de l'embryon à  $92 \pm 2h$  (J4) post-insémination : c'est le stade morula (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Cette compaction à J4 est de bon pronostic pour le développement embryonnaire (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011; Coticchio *et al.*, 2019). Enfin, à  $116 \pm 2h$  (J5) post-insémination, l'embryon est appelé blastocyste (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) (*Figure 8*). A ce stade, l'évaluation est complétée selon une classification différente incluant le nombre et le degré de compaction des cellules du trophoctoderme (TE) et de la Masse Cellulaire Interne (MCI), l'expansion du blastocyste et l'éclosion hors de la zone pellucide (Schoolcraft *et al.*, 1999). Ces évaluations permettent d'établir un score afin de sélectionner le(s) embryon(s) avec le meilleur potentiel implantatoire :

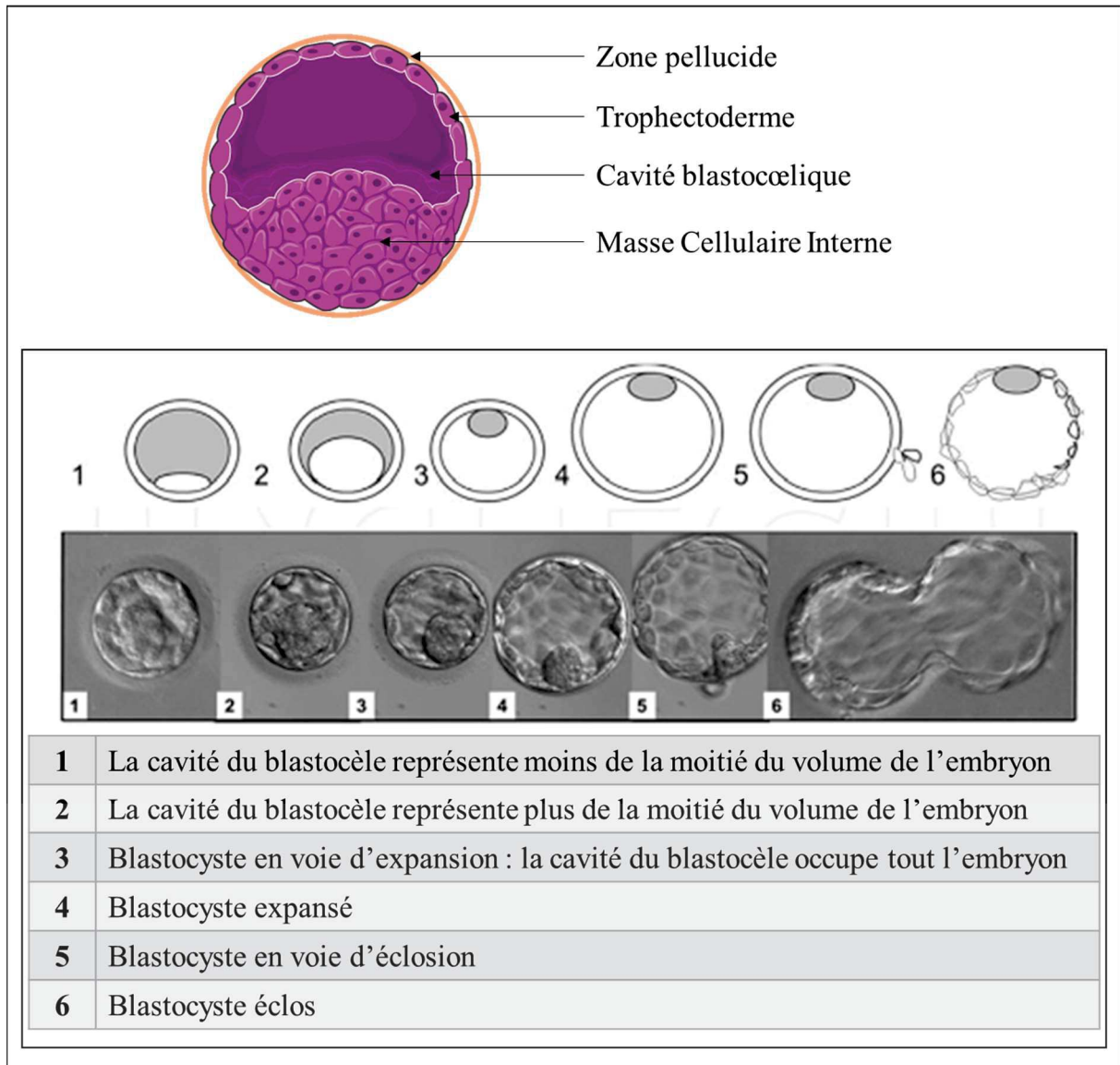
1<sup>er</sup> chiffre = taille du blastocèle de 1 à 6 selon son volume et stade de développement

(*Figure 8*)

1<sup>ère</sup> lettre = MCI A, B ou C selon le nombre et l'aspect des cellules (A : MCI compact, cellules nombreuses et bien individualisées ; B : MCI moins organisée et possédant moins de cellules ; C : MCI peu visible avec peu de cellules)

2<sup>ème</sup> lettre : TE A, B ou C selon le nombre et l'aspect des cellules (A : les cellules trophoblastiques forment un épithélium délimité ; B : l'épithélium est irrégulier ; C : l'épithélium est lisse)

Le ou les embryons de scores morpho-cinétiques satisfaisants sont directement transférés ou congelés en vue d'un transfert ultérieur.



**Figure 8 Culture embryonnaire, représentation schématique du blastocyste et classification.**

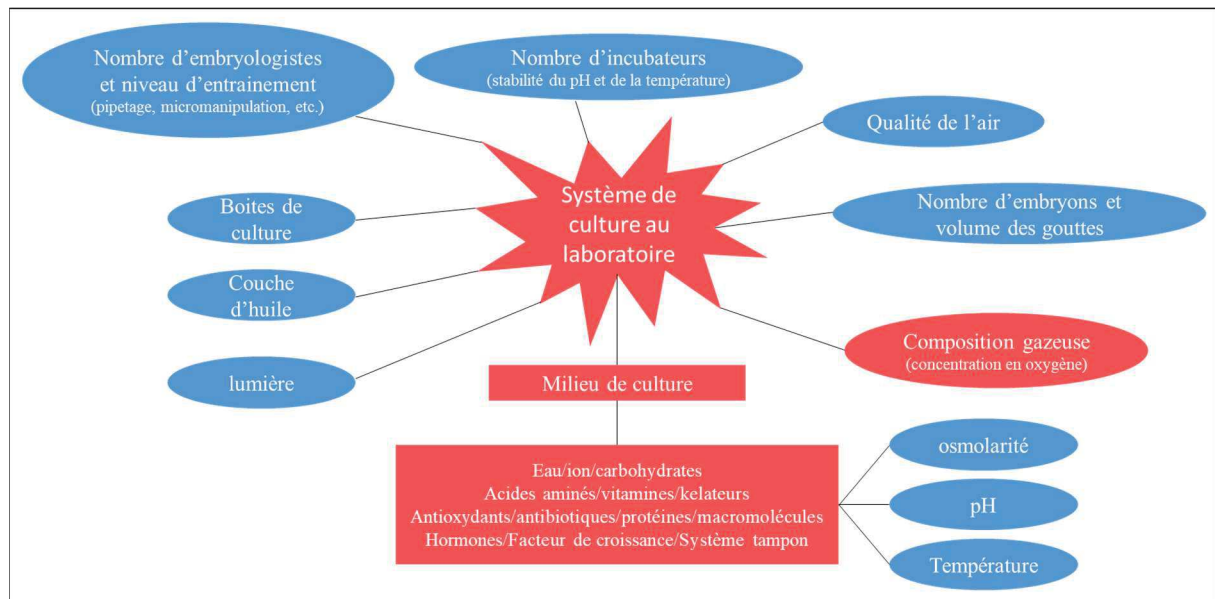
Le blastocyste est composé d'une masse cellulaire interne, d'une cavité blastocoelique et d'un trophoctoderme, entourés d'une zone pellucide. La classification de Gardner et Schoolcraft permet de sélectionner le ou les meilleur(s) blastocyste(s) pour le transfert. Cette classification est composée d'un chiffre suivi de 2 lettres. Le premier chiffre témoigne de la taille de la cavité blastocoelique et du développement du blastocyste (de 1, petite cavité blastocoelique, à 6, blastocyste éclos) (Schoolcraft et al., 1999).

### iii) Les conditions de culture de l'embryon *in vitro*

De nombreux paramètres extrinsèques doivent être contrôlés pendant la culture embryonnaire (*Figure 9*). Parmi ces paramètres, on peut contrôler la température qui doit être de 37°C, mimant ainsi les conditions *in vivo*. Il a été montré que la culture à 37°C entraînait une augmentation du nombre de cellules embryonnaires après 3 jours de développement ainsi qu'une augmentation du nombre de blastocystes totaux et utiles (c'est-à-dire transférables ou congelables) par rapport à une culture à 36°C (Hong *et al.*, 2014).

D'autre part, la concentration en CO<sub>2</sub> doit être comprise entre 5 et 6%, induisant ainsi un pH extracellulaire correct dans le milieu de culture de 7.2-7.4 (Swain, 2012). Un pH inadapté peut créer un environnement favorisant le stress cellulaire et ainsi altérer le métabolisme embryonnaire (Consensus Group, 2020).

De récentes publications montrent que la variation de tension en oxygène pendant la culture embryonnaire peut permettre d'améliorer les résultats en FIV (Nastri *et al.*, 2016). A ce jour, la concentration utilisée varie selon les centres d'AMP mondiaux. Physiologiquement, l'embryon évolue à 5-8% d'O<sub>2</sub> dans la trompe pendant les 3 premiers jours de son développement puis à approximativement 2% d'O<sub>2</sub> dans la cavité utérine où il continue son développement jusqu'à sa potentielle implantation dans l'endomètre. En 2011, la moitié des centres répartis dans 54 pays utilisait de faibles concentrations en O<sub>2</sub> (5%) pour la culture embryonnaire tandis que l'autre moitié des centres n'utilisait l'hypoxie que pendant la culture prolongée ou utilise la tension en oxygène atmosphérique de 20%, principalement pour des raisons économiques (Christianson *et al.*, 2014; De Munck *et al.*, 2019). Or, la culture hypoxique semble bénéfique au développement embryonnaire et aux résultats en FIV, en comparaison à une culture en tension atmosphérique (20% d'O<sub>2</sub>) car elle mime les conditions *in vivo* (Nastri *et al.*, 2016).



**Figure 9 Représentation schématique des facteurs de stress internes dans les laboratoires de FIV.**  
 Les facteurs chimiques (en rouge) et physiques (en bleu) qui affectent le développement des embryons cultivés in vitro (à partir de (Gardner *et al.*, 2013)  
 FIV : fécondation in vitro

### C. Stratégie de transfert embryonnaire

#### 1. Le jour de transfert : principalement J3 et J5

Le transfert embryonnaire, frais ou congelé, a lieu en général au stade clivé, après 2 ou 3 jours de culture, ou au stade blastocyste, à J5/J6 après culture prolongée. Le choix de l'embryon à transférer est principalement basé sur sa cinétique de développement et son aspect morphologique (ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs *et al.*, 2016). La décision du nombre d'embryons à transférer sera basée sur la qualité embryonnaire et leur stade de développement ainsi que sur l'âge de la femme et le souhait du couple (ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs *et al.*, 2016). A l'heure actuelle, le transfert d'embryon unique est privilégié afin d'éviter les grossesses multiples (ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs *et al.*, 2016).

## 2. Transfert frais

Le transfert est le dernier acte médical de la tentative et il consiste à déposer le ou les embryon(s) dans la cavité utérine de la patiente, pour laquelle un soutien de la phase lutéale aura préalablement été réalisé par la progestérone, à l'aide d'un cathéter par guidage échographique.

## 3. Transfert d'embryon(s) congelé(s)

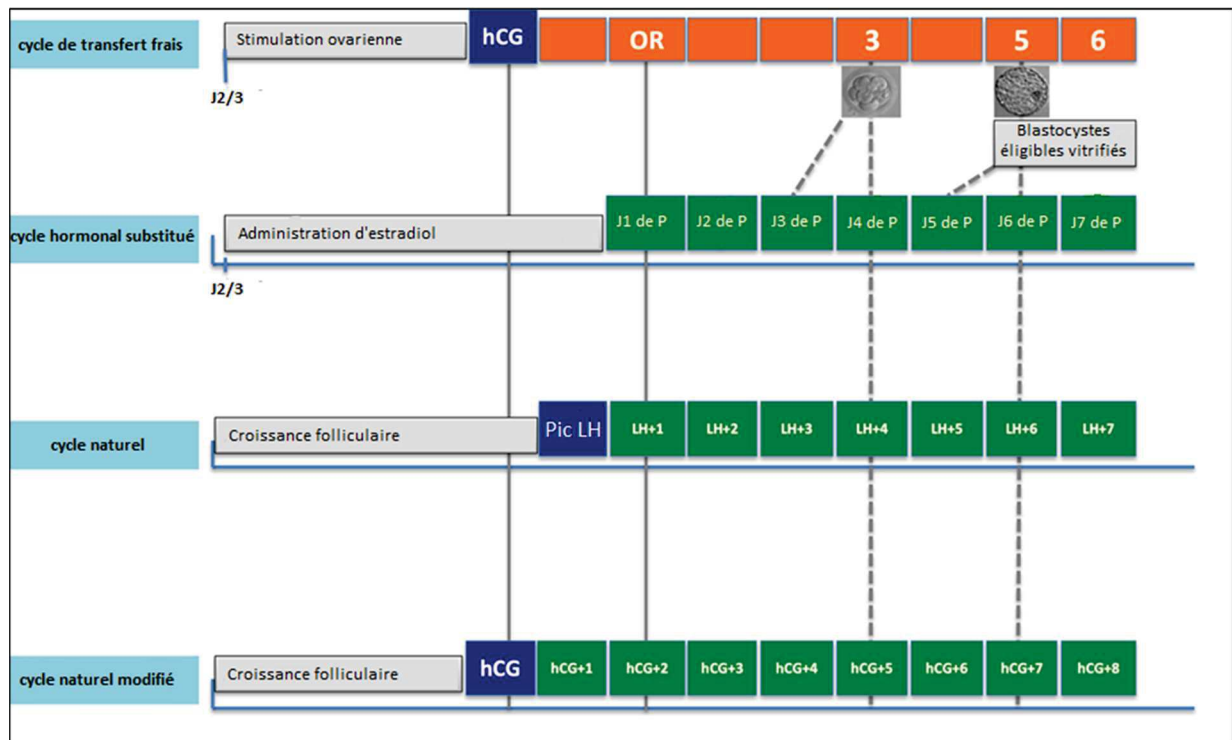
Il existe deux approches de cryopréservation possibles : la congélation lente et la vitrification. Depuis son autorisation en France en 2011, la vitrification est la technique la plus utilisée car elle augmente le taux de survie embryonnaire comparé à la congélation lente (Nagy *et al.*, 2020). Les embryons sont généralement congelés au stade clivé ou au stade de blastocyste (Nagy *et al.*, 2020).

Les embryons cryoconservés seront décongelés, puis transférés lors d'un cycle ultérieur. En routine, trois options sont utilisées pour préparer l'endomètre à un TEC : un cycle naturel, un cycle stimulé ou un cycle artificiel avec l'utilisation d'hormones exogènes (Bourdon *et al.*, 2021) (*Figure 10*).

L'efficacité du programme de congélation/décongélation embryonnaire est un critère important pour favoriser la politique de transfert d'embryon unique, réduisant ainsi les risques de grossesses multiples et les complications obstétriques et périnatales associées (Bourdon *et al.*, 2021; Sazonova *et al.*, 2013). Le TEC est de plus en plus utilisé en France, avec 37.2% des enfants nés en 2019 contre 34.6% en 2018 et 16% en 2013 (Rapport ABM). La politique de transfert d'embryon unique est également en augmentation en France avec 60.6% des transferts en FIV/ICSI en 2019 contre 55.1% en 2018 et seulement 46.3% en 2016 (Rapport ABM). La stratégie mono embryonnaire concerne également 80.2% des TEC réalisés en France en 2019 (Rapport ABM). En France, les taux d'implantation obtenus en TEC sont similaires à ceux obtenus après transfert d'embryon frais suite à une FIVc ou une ICSI (22.4%, 22.4% et 22.6%, respectivement ; Rapport ABM).

Les embryons surnuméraires ne faisant plus l'objet d'un projet parental pourront être donnés à la recherche, détruits ou donnés à un autre couple selon le souhait des patients (ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs *et al.*, 2016).





**Figure 10 synchronisation du stade embryonnaire avec la préparation endométriale.** Un embryon vitrifié au jour 3 pourra être transféré après 3 jour de progestérone pendant un cycle hormonal substitué, 4 jours après le pic de LH dans un cycle naturel ou 5 jours après le déclenchement de l'ovulation dans un cycle naturel modifié. De même, un blastocyste vitrifié au jour 5 devra être transféré après 5 jours de progestérone lors d'un cycle hormonal substitué, à LH+6 lors d'un cycle naturel ou 7 jours après le déclenchement de l'ovulation dans un cycle naturel modifié. (D'après Mumusoglu *et al.*, 2021). OR : récupération ovocytaire ; P : progestérone ; hCG : gonadotrophine chorionique humaine ; LH : hormone lutéinisante

### III. Les résultats en AMP

#### A. Les issues de tentatives en AMP

A travers le monde, plus de 7 millions d'enfants ont été conçus par AMP (Berntsen *et al.*, 2019). Les naissances par AMP concernent désormais 2 à 6% des naissances européennes (Berntsen *et al.*, 2019). Des définitions des différentes issues d'une tentative ont été proposées dans un glossaire international dans le but de standardiser la collection des données en AMP (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009) :

- en cas de dosage négatif de  $\beta$ hCG, on parle d'**échec d'implantation**. A la suite de trois transferts d'un ou plusieurs embryon(s) de bonne qualité sans l'obtention d'une grossesse, la patiente est considérée comme ayant des échecs d'implantation à répétition (ou RIF pour

Repeated Implantation Failure) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011; Zegers-Hochschild *et al.*, 2009).

- la **grossesse biochimique** est une grossesse diagnostiquée uniquement par un premier dosage de  $\beta$ hCG positif dans les urines ou le sang qui ne se développe pas en grossesse clinique (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009).

- La **grossesse clinique** est diagnostiquée par échographie grâce à la présence d'un ou plusieurs sac(s) gestationnel(s) avec détection des battements cardiaques (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009).

- la **fausse couche** est la perte spontanée d'une grossesse clinique qui se produit avant 20 semaines de grossesse ou la perte d'un embryon/fœtus de moins de 400g (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009).

-la **naissance vivante** est définie par l'expulsion ou l'extraction complète d'un enfant qui respire ou montre un autre signe de vie tel que le battement cardiaque, les pulsations du cordon ombilical ou des mouvements musculaires volontaires, quelle que soit la durée de la grossesse.

## B. Résultats en France

En 2015, l'activité d'AMP française représentait 11% de l'activité européenne, se classant ainsi en quatrième position derrière l'Espagne, la Russie et l'Allemagne (De Geyter *et al.*, 2020). En France, les enfants nés vivants, conçus après une AMP réalisée en 2019, représentaient 3.6% des enfants nés de la population générale (Rapport ABM).

Une augmentation progressive des taux d'implantation embryonnaire par transfert a été observée ces dernières années pour la majorité des techniques (en FIV/ICSI, 22.4% en 2019 contre 20.7% en 2016 ; Rapport ABM). L'amélioration progressive des résultats en FIV pourrait être liée à la hausse des transferts d'embryons obtenus après culture prolongée remplaçant les transferts d'embryons clivés.



## Chapitre 3 : Embryon-endomètre : un dialogue difficile

### I. Facteurs impactant les résultats

#### A. Facteurs impactant la fertilité féminine

Les femmes naissent avec un nombre défini de 1 à 2 millions d'ovocytes contenus au sein de follicules primordiaux. Cette réserve diminue progressivement pour atteindre 300 à 500 000 follicules primordiaux à la puberté, 25 000 à 37 ans et enfin 1 000 follicules primordiaux environ à la ménopause (Fritz and Jindal, 2018). Parallèlement à ce déclin quantitatif, on observe une diminution de la qualité ovocytaire avec l'âge principalement due à une augmentation de l'aneuploïdie des ovocytes (Fritz and Jindal, 2018). En effet, le taux d'aneuploïdie concerne environ 50% des ovocytes avant 30 ans (Escudero *et al.*, 2016) pour atteindre 90% à 43-45 ans (Escudero *et al.*, 2016; Franasiak *et al.*, 2014; Sauer, 2015). De même, les scores morphocinétiques embryonnaires sont impactés par l'âge maternel. Par exemple, Cimadomo *et al.* (2019) rapportent 17% de blastocystes de mauvaise qualité chez les patientes de moins de 35 ans alors que ce taux augmente à 32% chez les patientes de plus de 42 ans (Cimadomo *et al.*, 2019). Or, l'altération des scores morphocinétiques avec l'âge est corrélée à une diminution des taux d'implantation et de naissance (52% vs 17,1%,  $p < 0.01$  ; 44,8% vs 10,9%,  $p < 0.01$ , respectivement) (Cimadomo *et al.*, 2019). En AMP, la prise en charge des patientes âgées est donc difficile à cause de la faible quantité et qualité des ovocytes et des embryons correspondants (Sauer, 2015).

Le tabac, l'alcool ou le métabolisme de la patiente peuvent également impacter le potentiel reproducteur. Par exemple, un IMC trop faible ( $< 18.5 \text{ kg/m}^2$ ) ou trop élevé ( $> 25 \text{ kg/m}^2$ ) peut altérer le potentiel reproducteur et réduire la fertilité, notamment par une dérégulation du cycle menstruel menant à une anovulation (Imterat *et al.*, 2019). De plus, l'obésité est corrélée au SOPK qui impacte négativement la fertilité (Imterat *et al.*, 2019). Une étude de Pinborg *et al.* (2011) a montré une association linéaire négative entre l'IMC et le nombre d'ovocytes récoltés en protocole de FIV, ainsi qu'un nombre d'embryons disponibles plus faible pour les patientes en sous- et en surpoids (Imterat *et al.*, 2019; Pinborg *et al.*, 2011). Les taux de grossesse en AMP ont été rapportés de 10% plus faibles pour les patientes avec un IMC élevé ( $> 30 \text{ kg/m}^2$ ) comparé à des patientes de poids normal ( $18.5-24.9 \text{ kg/m}^2$ ) (Pinborg *et al.*, 2011).

## B. Facteurs impactant le potentiel implantatoire embryonnaire

Malgré les nombreux progrès dans le domaine de l'AMP, l'implantation embryonnaire reste un facteur limitant en FIV. En effet le potentiel implantatoire d'un embryon transféré est d'environ 15 à 20% (Bashiri *et al.*, 2018). Seules 50 à 60% des conceptions se poursuivent au-delà de la 20<sup>e</sup> semaine de gestation (Zhang *et al.*, 2013). Plusieurs solutions ont été proposées par les centres d'AMP pour améliorer ces taux.

Premièrement, le transfert tardif au stade de blastocystes (J5/J6) permet une meilleure sélection de l'embryon au sein de la cohorte par rapport au transfert d'embryon au stade clivé (J2/J3), ainsi qu'une meilleure synchronisation de l'endomètre avec le développement embryonnaire (Gardner and Balaban, 2016; Maheshwari *et al.*, 2016). Cette stratégie est associée à une augmentation du taux d'implantation et favorise la politique de transfert d'embryon unique, diminuant ainsi les taux de grossesses multiples, leurs complications et les coûts associés. En effet, une méta-analyse incluant 27 études a montré que les taux de grossesse clinique et de naissance vivante suivants un transfert frais étaient augmentés lors d'un transfert de blastocyste comparé au transfert d'embryon clivé (Glujovsky *et al.*, 2016). Cependant, le transfert de blastocyste pourrait être associé à des risques pour certains auteurs à cause d'un microenvironnement *in vitro* de qualité inférieure à la conception *in vivo* conduisant à un échec de blastulation pour certains embryons qui auraient pu s'implanter dans la muqueuse utérine s'ils avaient été transférés au stade clivé (Maheshwari *et al.*, 2016; Martins *et al.*, 2017). Cela reste une hypothèse qui n'a pas été démontrée à ce jour. Une méta-analyse récente comparant le transfert d'embryons clivés (J2/3) au transfert de blastocyste (J5/6) n'a pas retrouvé de supériorité pour le transfert de blastocyste en terme de grossesse clinique, naissance vivante, fausse couche et taux de grossesse cumulés (Martins *et al.*, 2017).

D'autre part, l'évaluation de la qualité dans le choix du blastocyste à transférer est prédictive de la survenue d'une grossesse (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). En effet, une étude prospective multicentrique incluant 618 cycles d'ICSI avec un transfert de blastocyste unique à J5, a montré une corrélation significative entre l'obtention d'une naissance vivante et le stade du blastocyste (Van den Abbeel *et al.*, 2013). Seuls 2% des transferts d'un jeune blastocyste de stade 1 (B1) sont associées à une naissance vivante. Ce taux augmente progressivement à 3% pour un transfert au stade B2, puis 9% pour un B3 et enfin 52% avec un transfert de blastocyste de stade B4, respectivement. Le taux de naissance vivante diminue ensuite à 35% avec un blastocyste de

stade 5 (Van den Abbeel *et al.*, 2013). De plus, la qualité du trophoctoderme semble être un facteur prédictif plus important que la qualité de la MCI dans la survenue d'une naissance vivante (Storr *et al.*, 2019).

Cependant, la culture prolongée jusqu'au stade blastocyste ne garantit pas pour autant la sélection d'un embryon euploïde (Gardner and Balaban, 2016; Maheshwari *et al.*, 2016). Alors que les patientes de moins de 35 ans obtiennent seulement 32% de blastocystes aneuploïdes, le taux d'aneuploïdie augmentent à presque 45% entre 35 et 40 ans puis à environ 80% passé 40 ans (Harton *et al.*, 2013). Les transferts de blastocystes euploïdes entraînent des taux d'implantation supérieurs à 50% (Dahdouh *et al.*, 2015). A l'inverse, l'aneuploïdie embryonnaire est associée à une diminution des taux d'implantation et de naissances vivantes ainsi qu'à une augmentation des risques de fausse-couche, indépendamment de l'âge maternel (Harton *et al.*, 2013).

## II. Optimiser la synchronisation embryo-maternelle

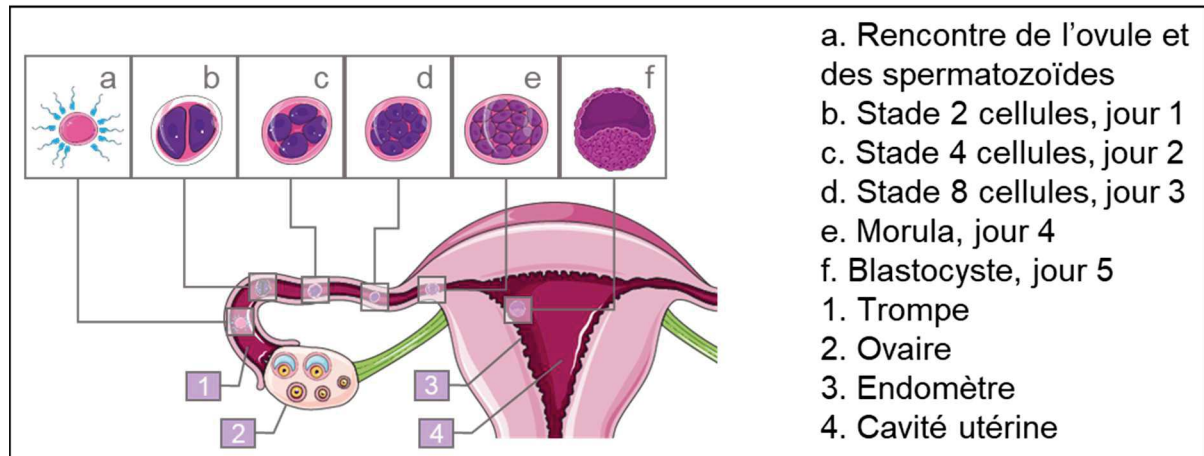
### A. Physiologie : synchronisation entre le blastocyste en développement et l'endomètre réceptif

L'implantation requiert une interaction entre le blastocyste et l'endomètre pendant la fenêtre implantatoire (Diedrich *et al.*, 2007). Le succès de l'implantation embryonnaire dépend de trois facteurs : un embryon viable, un endomètre réceptif et un dialogue synchronisé entre les deux entités.

#### 1. Développement du blastocyste

La fécondation de l'ovocyte mature par un spermatozoïde fécondant, suite à sa capacitation et réaction acrosomique, a lieu dans la trompe utérine une dizaine d'heures après son expulsion de l'ovaire (*Figure 11*). La fusion des deux gamètes déclenche la formation du zygote par l'induction de la fin de la méiose entraînant l'expulsion du second globule polaire, suivie de la formation des PN (*Figure 6*). Le zygote commence alors ses divisions cellulaires mitotiques. Parallèlement, il entame sa migration dans la trompe de Fallope vers la cavité utérine (*Figure 11*). L'embryon forme des blastomères puis se compacte après 4 jours de développement pour devenir une morula, toujours enfermée dans la zone pellucide qui entourait initialement l'ovocyte. A ce stade, il entre dans la cavité utérine pour terminer son développement (Diedrich *et al.*, 2007) (*Figure 11*). Une cavité blastocœlique se creuse à l'intérieur de l'embryon après 5 ou 6 jours de développement. L'embryon, alors devenu un blastocyste, est composé d'une MCI,

qui deviendra le futur fœtus en cas d'implantation, et du trophoctoderme, qui deviendra le placenta (Zhang *et al.*, 2013) (*Figure 8*).



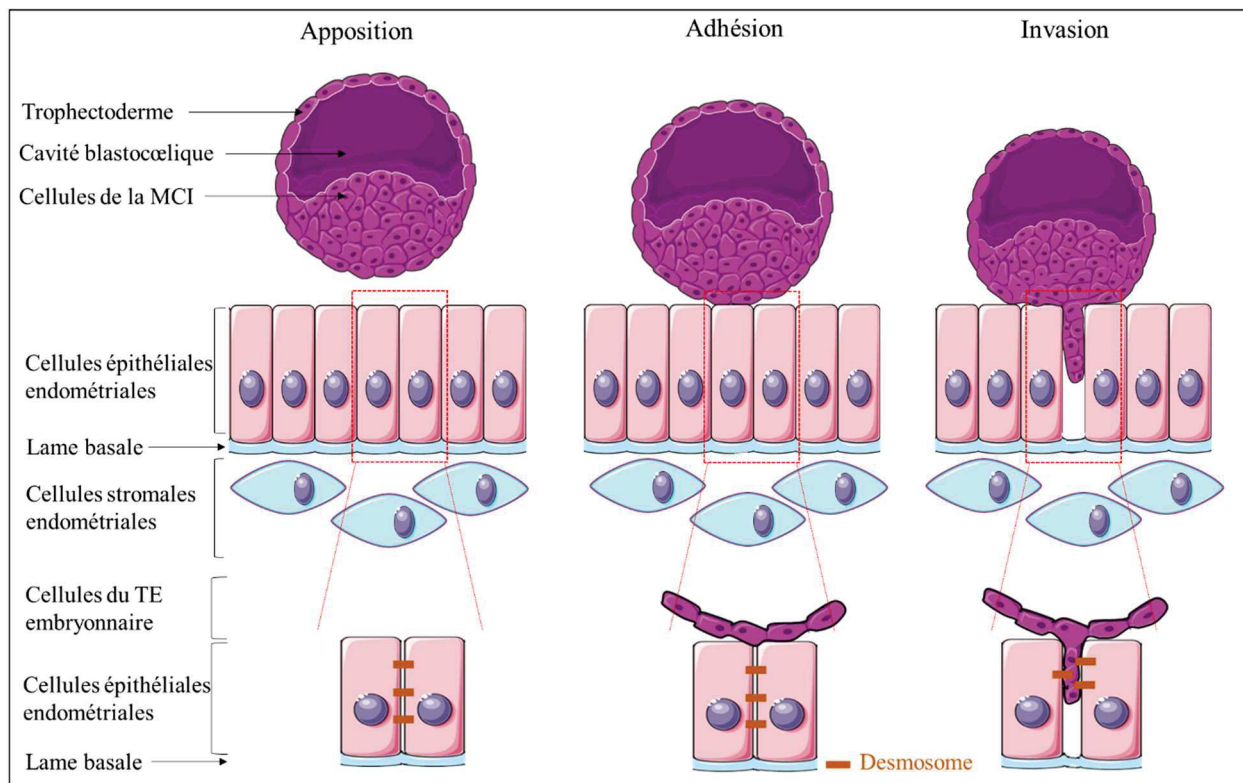
**Figure 11** Progression de l'embryon préimplantatoire humain en développement depuis sa fécondation dans la trompe de Fallope à la cavité utérine.

## 2. Apposition

Le blastocyste éclos de la zone pellucide par une succession de contractions et d'expansions (également appelé hatching). Une fois libre, la MCI se positionne face à l'endomètre (Diedrich *et al.*, 2007) (*Figure 12*). Dès l'apposition, l'épithélium trophoctoderme se différencie en deux feuillets distincts : le cytotrophoblaste et le syncytiotrophoblaste.

## 3. Adhésion

Les premiers contacts d'ancrage sont mis en place par les cellules épithéliales endométriales. Des complexes jonctionnels se forment entre les membranes apicolatérales des cellules épithéliales endométriales et le trophoctoderme embryonnaire par fusion de leurs desmosomes (*Figure 12*) (Buck *et al.*, 2015). Des signaux locaux paracrines sont produits entre l'embryon et l'épithélium. A la suite de cette seconde étape, l'adhésion entre les deux entités est solide.



**Figure 12 Les 3 étapes de l'implantation embryonnaire : apposition, adhésion et invasion.** L'apposition comprend l'éclosion du blastocyste et son orientation face à l'endomètre, où les cellules épithéliales sont jointes par des desmosomes. L'adhésion correspond au premier contact entre les cellules du trophoctoderme embryonnaire et les cellules épithéliales endométriales. Enfin, l'invasion est permise par le blastocyste qui dégrade la MEC pour établir un contact avec les cellules stromales et le réseau vasculaire maternel.

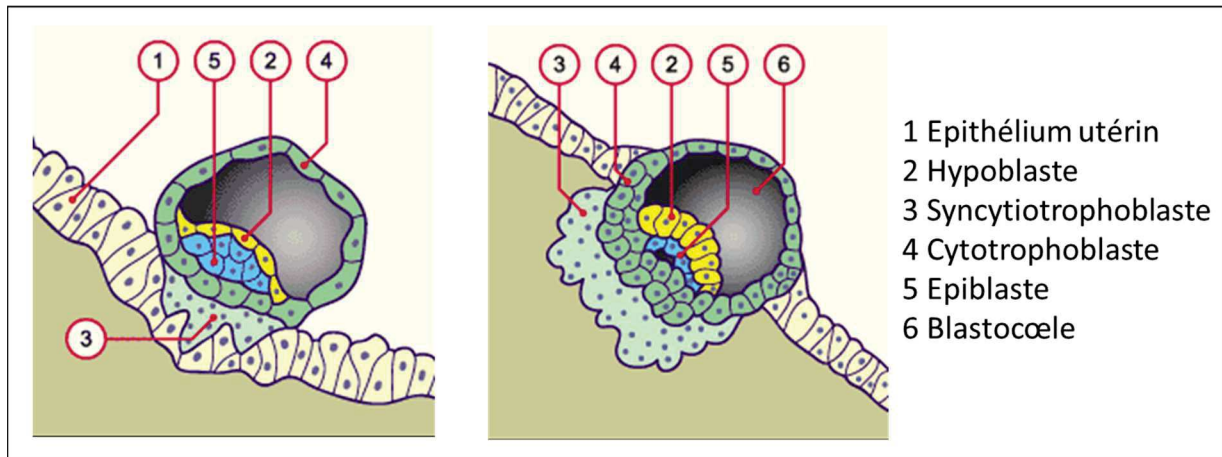
MCI : masse cellulaire interne ; TE : trophoctoderme ; MEC : matrice extracellulaire

#### 4. Invasion

Enfin, les cellules du TE déplacent les cellules épithéliales maternelles et traversent la lame basale pour atteindre les cellules stromales maternelles (Diedrich *et al.*, 2007). Le blastocyste s'enfouit dans la muqueuse et dégrade la Matrice ExtraCellulaire (MEC) afin d'établir un contact avec le réseau vasculaire maternel (*Figure 12 et figure 13*).

Le cytotrophoblaste consiste en une couche interne de cellules, qui est le siège d'une activité mitotique intense. Les cellules externes du cytotrophoblaste fusionnent pour alimenter le syncytiotrophoblaste (*Figure 13*). Ce dernier est pourvu de capacités enzymatiques lytiques et sécrètent des facteurs, notamment des métalloprotéinase matricielles (MMP), induisant l'apoptose des cellules épithéliales de la muqueuse utérine, lui permettant de traverser la lame basale et de pénétrer dans le stroma. Le syncytiotrophoblaste se développe rapidement et

entoure complètement l'embryon lorsque la pénétration est complète. Au 10<sup>ème</sup> jour après la fécondation, le syncytiotrophoblaste synthétise l'hCG. C'est un facteur primordial pour l'établissement et le maintien de la grossesse, ce qui lui confère le rôle de biomarqueur de la grossesse (Makrigiannakis *et al.*, 2017).



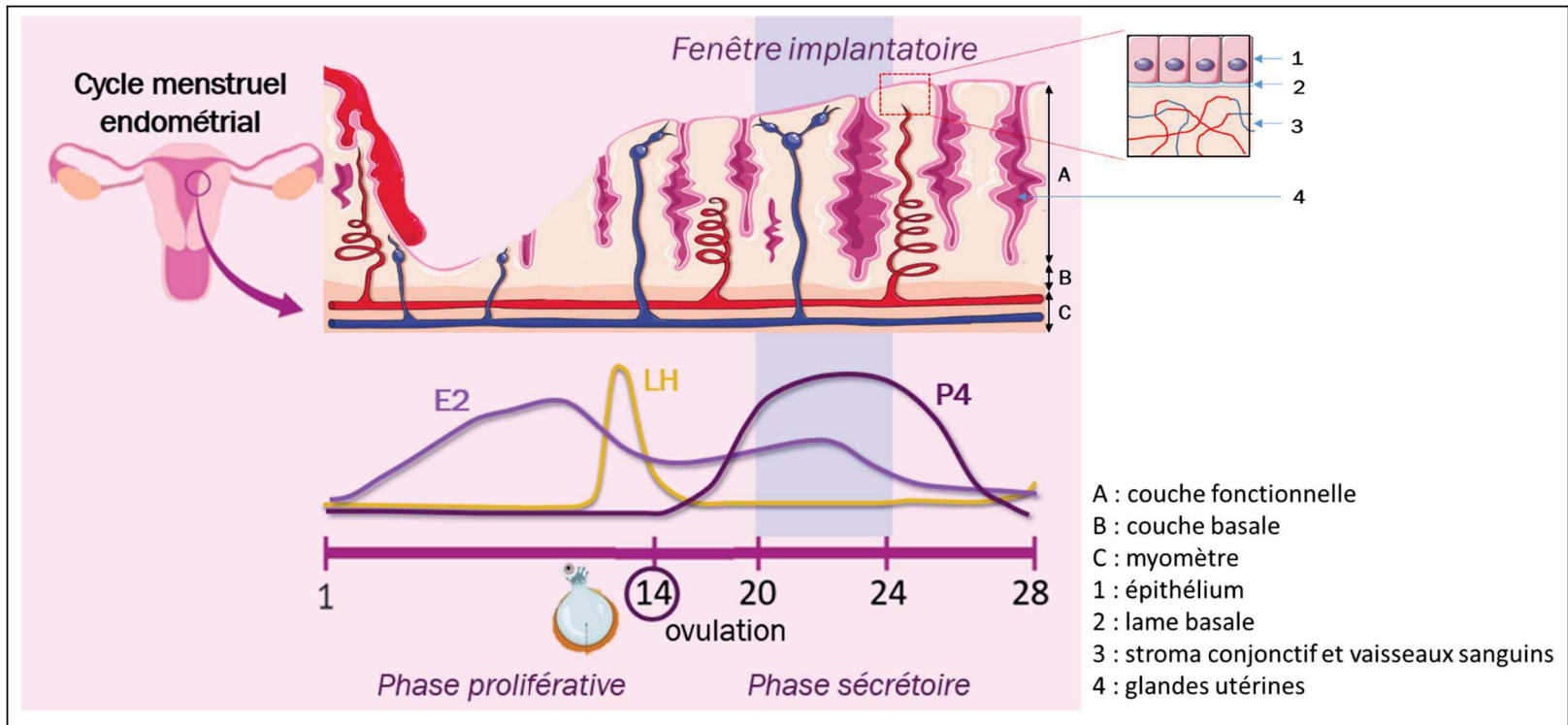
**Figure 13 Invasion de l'endomètre par le blastocyste et différenciation des cellules du trophoctoderme et de la masse cellulaire interne.** Les cellules du trophoctoderme deviennent du cytotrophoblaste et du syncytiotrophoblaste. Les cellules de la Masse Cellulaire Interne se différencient en épiblaste et hypoblaste qui deviendront le fœtus par la suite (d'après embryology.ch).

## B. Nouveaux outils d'évaluation de la réceptivité endométriale

### 1. Décidualisation et Fenêtre implantatoire

Depuis la puberté jusqu'à la ménopause, l'endomètre subit des modifications mensuelles cycliques dans le but de se préparer à initier une grossesse. Cette muqueuse, superposée sur le myomètre utérin, est unique par sa capacité à se régénérer et à se différencier de façon cyclique (Diedrich *et al.*, 2007; Owusu-Akyaw *et al.*, 2019). Elle est composée d'une couche fonctionnelle, la plus superficielle, et d'une basale, mince et adjacente au myomètre (*Figure 14*) (Diedrich *et al.*, 2007; Owusu-Akyaw *et al.*, 2019).





**Figure 14 Le cycle menstruel endométrial.**

L'endomètre, superposé au myomètre, est composé d'une couche basale et d'une couche fonctionnelle. La couche fonctionnelle est constituée d'un épithélium, d'une lame basale et d'un stroma conjonctif. L'endomètre est modifié cycliquement sous l'influence des hormones sexuelle. La première phase, dite proliférative, comprend les menstruations et une phase de prolifération des cellules endométriale sous le contrôle majoritaire des œstrogènes. Elle est suivie par l'ovulation déclenchée par un pic de LH. Enfin, la phase sécrétoire, régie par la progestérone sécrétée par le corps jaune, favorise la différenciation des cellules endométriale et la sécrétion de mucus par les glandes endométriales, en vue d'une éventuelle implantation embryonnaire. La fenêtre implantatoire s'ouvre au milieu de la phase sécrétoire. LH : hormone lutéinisante ; E2 : oestrogènes ; P4 : progestérone

La couche fonctionnelle de l'endomètre est constituée d'un épithélium luminal et glandulaire reposant sur une lame basale et d'un épais stroma de tissu conjonctif (*Figure 14*). Le stroma est composé de la MEC, de cellules fibroblastiques stromales, de vaisseaux sanguins et de cellules immunocompétentes : macrophage, leucocytes, lymphocytes naturels tueurs utérins (uterine natural killer ou uNK) et autres lymphocytes (*Figure 15*) (Wang *et al.*, 2021).

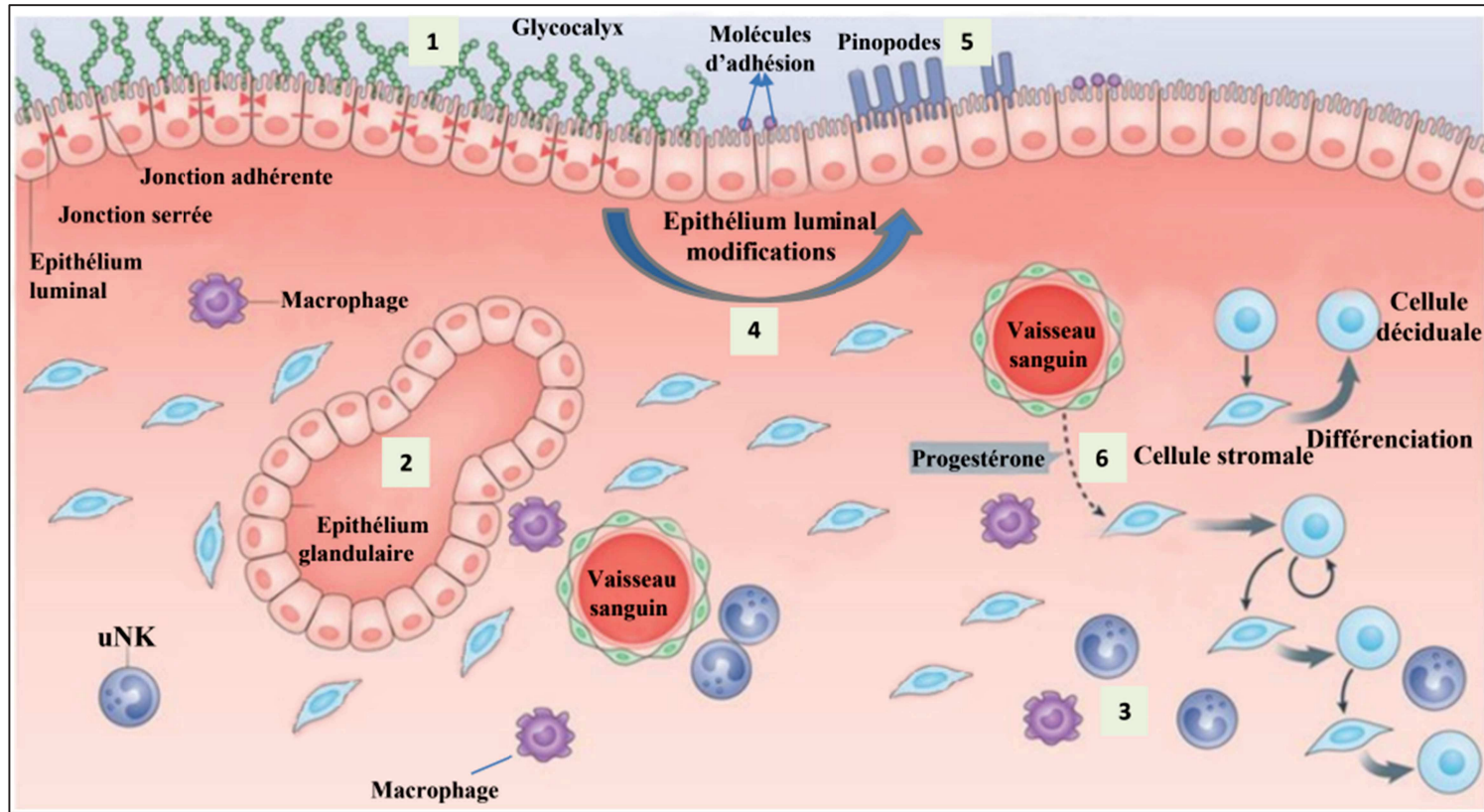
Le cycle endométrial est composé de 2 phases sous l'influence des hormones stéroïdiennes ovariennes :

- La phase proliférative débute par une phase menstruelle, survenant en l'absence d'implantation au cycle précédent. Par convention, le jour 1 (J1) du cycle menstruel est défini par le premier jour des menstruations. Les menstruations sont définies par un écoulement périodique de sang et de tissu muqueux, constitué de l'endomètre décidualisé superficiel, déclenchées par une chute du taux de progestérone circulant (*Figure 14*) (Garry *et al.*, 2009; Gellersen and Brosens, 2014). A la suite des menstruations, l'épithélium luminal se reconstruit à partir de la lame basale (Diedrich *et al.*, 2007; Owusu-Akyaw *et al.*, 2019), les glandes stromales deviennent rectilignes et étroites et le stroma s'épaissit et se vascularise. La prolifération des cellules épithéliales et stromales de l'endomètre est stimulée par l'oestradiol sécrété par les follicules ovariens en croissance (Owusu-Akyaw *et al.*, 2019). (*Figure 14*).

- La phase sécrétoire, à la suite de l'ovulation est majoritairement contrôlée par la progestérone, sécrétée par le corps jaune, qui permet d'inhiber la croissance induite par les oestrogènes et de favoriser la différenciation cellulaire (*Figure 14*). Pendant cette seconde période, l'endomètre se différencie en préparation de l'implantation embryonnaire. Les glandes deviennent tortueuses, se dilatent et s'élargissent. Elles développent leur activité sécrétoire et produisent une sécrétion épaisse, abondante et riche en glycogène et glycoprotéines, appelé mucus. Les artères et vaisseaux sanguins parallèles aux glandes endométriales s'allongent et augmentent de diamètre, elles envahissent les couches superficielles et deviennent fortement spiralées (Chen *et al.*, 2017).

La fenêtre implantatoire, au milieu de la phase sécrétoire, correspond au moment où l'embryon peut s'implanter dans la muqueuse utérine afin de continuer son développement (*Figure 14*). Pour cela, le compartiment stromal endométrial doit subir des modifications morphologiques et biochimiques, indépendamment de la présence d'un embryon (*Figure 15*) (Gellersen and Brosens, 2014).





**Figure 15 Modification endométriales pendant la fenêtre implantatoire.** Avant la fenêtre implantatoire, l'endomètre empêche l'adhésion de l'embryon grâce aux cellules de l'épithélium luminal polarisées et interconnectées (jonctions adhérentes et jonctions serrées), recouvertes par le glycocalyx et par des molécules anti-adhésives (1). Puis, l'épithélium glandulaire devient sécrétoire (2), les cellules uNK prolifèrent et les macrophages pénètrent l'endomètre (3). L'épithélium luminal subit ensuite des modifications, on parle de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (4) le glycocalyx et les facteurs de surface modifiés entraînant la perte de polarité, puis apparition des pinopodes en surface. (5). Enfin, la décidualisation est initiée par la progestérone dans les cellules stromales adjacentes aux vaisseaux sanguins : elles deviennent sécrétoires et arrondies (6). (Evans et al., 2016) uNK : natural killer utérin

Le processus de décidualisation est sous le contrôle majoritaire de la progestérone sécrétée par le corps jaune. Elle est définie par la différenciation des cellules du stroma en cellules déciduales (*Figure 15*). Alors que les cellules stromales endométriales ont une apparence fibroblastique présentant un réticulum endoplasmique bien développé et un appareil de Golgi, un petit cytoplasme et un noyau allongé et dentelé ; les cellules déciduales ont des noyaux arrondis, une augmentation des nucléoles, une dilatation du réticulum endoplasmique et du Golgi et enfin une accumulation de gouttelettes de glycogène et de lipides dans leur cytoplasme en expansion (Gellersen and Brosens, 2014).

Les cellules déciduales sécrètent alors des facteurs de croissance, cytokines et protéases, des régulateurs de la réponse immunologique, de la vascularisation et de la régulation de l'implantation embryonnaire. La décidua ainsi créée est une matrice extracellulaire dense qui forme une barrière physique et régule l'invasion trophoblastique. Elle favorise l'attachement de l'embryon (*Figure 15*) (Evans *et al.*, 2016).

Ainsi décidualisé, l'endomètre devient réceptif, c'est-à-dire prêt à l'implantation embryonnaire, environ 7 à 10 jours après la décharge de LH. Cette fenêtre implantatoire (*Figure 14*) est courte puisqu'elle dure environ 48 heures (Haouzi *et al.*, 2021). En dehors de cette fenêtre, l'endomètre est réfractaire à l'implantation embryonnaire.

## 2. Evaluation de la réceptivité en AMP (Baron *et al.*, 2021)

L'exploration de la réceptivité endométriale pourrait-elle permettre d'améliorer la synchronisation entre l'embryon en développement et l'endomètre en pratique clinique ? Ma revue intitulée "la réceptivité endométriale en AMP : une piste à ne pas oublier devant un échec d'implantation" vise à faire un état des lieux des différentes approches disponibles en pratique clinique et en recherche pour évaluer la réceptivité endométriale chez les patientes prises en charge en AMP.



Disponible en ligne sur

**ScienceDirect**  
[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Elsevier Masson France

**EM|consulte**  
[www.em-consulte.com](http://www.em-consulte.com)


Mise au point

## La réceptivité endométriale en aide médicale à la procréation : Une piste à ne pas oublier devant un échec d'implantation



### *Endometrial receptivity in assisted reproductive techniques: An aspect to investigate in embryo implantation failure*

C. Baron<sup>a</sup>, D. Haouzi<sup>a</sup>, A. Gala<sup>b</sup>, A. Ferrieres-Hoa<sup>b</sup>, E. Vintejou<sup>c</sup>, S. Brouillet<sup>a,b,d,e,\*</sup>,  
S. Hamamah<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Inserm U1203, développement embryonnaire précoce humain et pluripotence, université Montpellier, Montpellier, France

<sup>b</sup> Département de biologie de la reproduction, biologie de la reproduction et diagnostic pré-implantatoire, université Montpellier, CHU Montpellier, Montpellier, France

<sup>c</sup> Département de médecine de la reproduction, CHU de Montpellier, 34000 Montpellier, France

<sup>d</sup> Inserm 1036, laboratoire biologie du cancer et de l'infection (BCI), Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA), institut de biosciences et biotechnologies de Grenoble (BIG), université Grenoble-Alpes, 38000 Grenoble, France

<sup>e</sup> Centre clinique et biologique d'assistance médicale à la procréation – centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme humains (CECOS), hôpital Couple-Enfant, centre hospitalier universitaire de Grenoble, La Tronche, France

#### INFO ARTICLE

Historique de l'article :  
Reçu le 5 février 2020  
Disponible sur Internet le 25 juillet 2020

Mots clés :  
Infertilité  
Implantation embryonnaire  
Endomètre  
Assistance médicale à la procréation  
Fécondation in vitro  
Réceptivité endométriale  
Fenêtre implantaire

Keywords:  
Infertility  
Embryo implantation  
Endometrium  
Assisted reproductive techniques  
In vitro fertilization  
Endometrial receptivity  
Window of implantation

#### RÉSUMÉ

L'infertilité touche entre 8 et 12 % des couples en âge de procréer à travers le monde. Malgré l'amélioration des techniques d'aide médicale à la procréation (AMP), les taux de naissances vivantes restent toujours limités. En pratique clinique, l'imagerie et la microscopie sont actuellement largement utilisées, mais leur efficacité diagnostique reste limitée. En recherche, l'émergence de techniques innovantes dites OMICS permettrait d'améliorer l'identification de la fenêtre implantaire, tout en progressant dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les échecs d'implantation embryonnaire. À ce jour, l'approche transcriptomique semble être la piste la plus prometteuse en recherche clinique. L'objectif de cette revue est de faire un état des lieux des résultats obtenus à ce jour avec les différentes approches disponibles en pratique clinique et en recherche pour évaluer la réceptivité endométriale chez les patientes prises en charge en AMP.

© 2020 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

#### ABSTRACT

Infertility affects between 8 and 12% of reproductive-age couples worldwide. Despite improvements in assisted reproductive techniques (ART), live birth rates are still limited. In clinical practice, imaging and microscopy are currently widely used, but their diagnostic effectiveness remains limited. In research, the emergence of innovative techniques named OMICS would improve the identification of the implantation window, while progressing in the understanding of the pathophysiological mechanisms involved in embryo implantation failures. To date, transcriptomic analysis seems to be the most promising approach in clinical research. The objective of this review is to present the results obtained with the different approaches available in clinical practice and in research to assess endometrial receptivity in patients undergoing ART.

© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

\* Auteurs correspondants. Service de biologie de la reproduction/DPI, hôpital Arnaud-de-Villeneuve, 34295 Montpellier cedex 5, France.  
Adresses e-mail : s-brouillet@chu-montpellier.fr (S. Brouillet), s-hamamah@chu-montpellier.fr (S. Hamamah).

<sup>1</sup> Brouillet Sophie et Hamamah Samir ont contribué de façon équivalente à cet article.



## 1. Introduction

L'infertilité touche entre 8 et 12 % des couples en âge de procréer à travers le monde [1]. Une des solutions pour les couples infertiles pour tenter de surmonter l'infertilité est le recours à l'aide médicale à la procréation (AMP). L'AMP comprend les techniques d'insémination intra-utérine (IIU) et de fécondation in vitro (FIV) conventionnelle (FIVc) ou avec micro-injection d'un spermatozoïde (ICSI). Malgré l'amélioration des techniques d'AMP ces dernières décennies, les résultats restent limités, avec environ une tentative d'IIU sur neuf et moins d'une tentative de FIV sur six<sup>2</sup> aboutissant à une naissance vivante [2]. Une des causes majeures de ces résultats limités reste l'échec d'implantation qui correspond cliniquement à l'absence d'implantation embryonnaire<sup>3</sup> ou à la grossesse biochimique<sup>4</sup> [3]. Les échecs d'implantation peuvent avoir de multiples causes : une cause embryonnaire, une cause endométriale, ou simplement résulter d'un défaut de synchronisation entre le blastocyste en développement et l'endomètre réceptif (Fig. 1) [4–6].

En effet, l'implantation embryonnaire nécessite une communication bidirectionnelle coordonnée entre l'embryon et l'endomètre. L'endomètre est réceptif pendant une courte période du cycle menstruel : la « fenêtre implantatoire » qui s'étend théoriquement entre les jours 20 (j20) et 24 (j24) d'un cycle menstruel de 28 jours, soit entre 7 et 11 jours après le pic de l'hormone lutéinisante (LH) (LH + 7 et LH + 11, respectivement) [7–9]. Les cellules endométriales stromales, qui présentaient initialement un phénotype de cellules épithéliales allongées au début de la phase lutéale, se transforment alors en cellules déciduales sécrétrices de morphologie arrondie sous l'action de la progestérone [10]. En parallèle, la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales endométriales aboutissent au développement de glandes sécrétrices dans l'endomètre [10]. L'implantation se déroule selon trois phases successives : l'apposition, l'adhésion et l'invasion [11]. Pendant l'étape d'apposition, le pôle embryonnaire du blastocyste éclos s'oriente face à l'endomètre maternel et commence à exprimer des molécules d'adhésion à sa surface (dont les *L-selectins* et certaines intégrines) (Fig. 1) [11]. En parallèle, des pinopodes (micro-protrusions membranaires transitoires) se développent au pôle apical des cellules épithéliales endométriales sous l'action de la progestérone [12,13]. Ces pinopodes pourraient faciliter l'attraction du blastocyste vers l'endomètre ainsi que promouvoir sa survie via la libération de vésicules sécrétrices contenant des nutriments [12]. Les pinopodes expriment également des *L-selectin ligands*, qui interagissent avec les *L-selectins* exprimés par le blastocyste pendant les étapes d'apposition et d'adhésion, favorisant ainsi l'établissement d'un contact étroit entre le blastocyste et l'endomètre. Pendant l'étape d'adhésion, le blastocyste se fixe plus stablement à l'épithélium utérin grâce au clivage de la mucine-1 (MUC-1, une molécule anti-adhésion) et grâce à certaines intégrines (par exemple,  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ ) exprimées à la surface des cellules épithéliales endométriales (Fig. 1) [11]. Pendant l'étape d'invasion, le trophoblaste exprime des protrusions (appelées *invadopodia*) qui s'immiscent au travers des cellules épithéliales et participent à la dégradation de la matrice extracellulaire. Les macrophages, lymphocytes et leucocytes (en particulier les *uterine natural killers* (uNK) activés) participent au contrôle de l'invasion trophoblastique, à la tolérance immunologique, au remodelage vasculaire, ainsi qu'au maintien de la décidualisation pendant l'étape d'invasion. Le trophoblaste se différencie alors en cytotrophoblaste et

syncytiotrophoblaste, aboutissant ainsi à l'enfouissement complet du blastocyste dans l'endomètre autour de LH + 9 [11]. À ce jour, la compréhension des mécanismes physiologiques et pathologiques impliqués dans l'implantation embryonnaire humaine est encore loin d'être complète.

Les échecs d'implantation sont fréquents en fertilité spontanée comme en AMP. En effet, moins d'un tiers des conceptions semble aboutir à une naissance en fertilité spontanée, avec 30 % des ovocytes fécondés ne parvenant pas à s'implanter et 30 % des embryons implantés stoppant leur développement avant la quatrième semaine d'aménorrhée [5]. Ces résultats semblent comparables à ceux obtenus actuellement en AMP. À ce jour, la compréhension des causes impliquées dans ces échecs d'implantation progresse, notamment grâce aux études réalisées chez les patientes sujettes aux échecs d'implantation à répétition. L'aneuploïdie et le mosaïcisme embryonnaires sont retrouvés dans une part importante de ces échecs [14,15]. Néanmoins, d'autres facteurs embryonnaires ou endométriaux sont également impliqués, en particulier, dans les 30 à 50 % des tentatives associées au transfert de blastocyste(s) euploïde(s) évolutif(s) qui se soldent pourtant par une absence de grossesse clinique [16–18]. Les échecs causés par l'absence ou le décalage dans le temps de la fenêtre implantatoire pourraient bénéficier du développement actuel des approches innovantes de l'évaluation de la réceptivité endométriale, optimisant ainsi les conditions de réalisation du transfert embryonnaire et favorisant l'augmentation des taux de succès en AMP. L'objectif de cette revue est de synthétiser les résultats des différentes approches disponibles en pratique clinique et en recherche pour évaluer la réceptivité endométriale chez les patientes prises en charge en AMP. Les perspectives d'utilisation de ces techniques seront également discutées.

## 2. Les approches morphologiques conventionnelles

### 2.1. Par imagerie

L'évaluation de la réceptivité endométriale par imagerie est une approche non invasive qui repose sur la réalisation d'une échographie endovaginale permettant d'apprécier certaines caractéristiques morphologiques ou fonctionnelles de l'endomètre. Elle comprend l'échographie à ultrasons et l'échographie Doppler.

En pratique clinique, l'évaluation de l'épaisseur de l'endomètre par échographie à ultrasons reste l'approche la plus répandue pour apprécier la réceptivité endométriale [19,20]. À ce jour, l'ensemble des études suggère que l'épaisseur de l'endomètre soit positivement associée à l'implantation embryonnaire. En effet, Craciunas et al. ont rapporté dans une méta-analyse récente l'association significative entre une épaisseur > 6 mm le jour de l'induction de l'ovulation et l'obtention d'une grossesse clinique suite à une IIU ( $p = 0,0009$ ) ou à un transfert embryonnaire frais en FIV ( $p < 0,0001$ , respectivement) [19]. De même, Liu et al. ont démontré dans une étude multicentrique l'association entre l'augmentation de l'épaisseur de l'endomètre mesuré le jour de l'induction de l'ovulation et les taux de naissances vivantes après transfert embryonnaire frais en FIV (avec 18,1 % pour 5–5,9 mm ; 24,6 % pour 6–6,9 mm ; 25,5 % pour 7–7,9 mm ; et 33,7 % pour  $\geq 8$  mm, respectivement) [21]. Pour autant, l'implantation embryonnaire reste possible dans les endomètres fins [21,22], démontrant les limites de cette approche et la nécessité de valider d'autres critères prédictifs du succès de la tentative d'AMP.

D'autres critères d'imageries sont en cours d'évaluation, comme l'impact positif de l'augmentation de la vascularisation endométriale évaluée par échographie Doppler [19,23] ou de la faible contractilité utérine évaluée par échographie endovaginale [24,25] sur le succès des tentatives d'AMP. En revanche, l'impact de la

<sup>2</sup> Résultats pour l'ensemble des transferts frais et transferts d'embryons congelés/décongelés (TEC).

<sup>3</sup> Définie par une sécrétion d'hCG urinaire ou sanguine indétectable.

<sup>4</sup> Définie par la détection positive d'hCG urinaire/sanguine mais une absence de sac gestationnel ou de battements cardiaques à l'échographie.



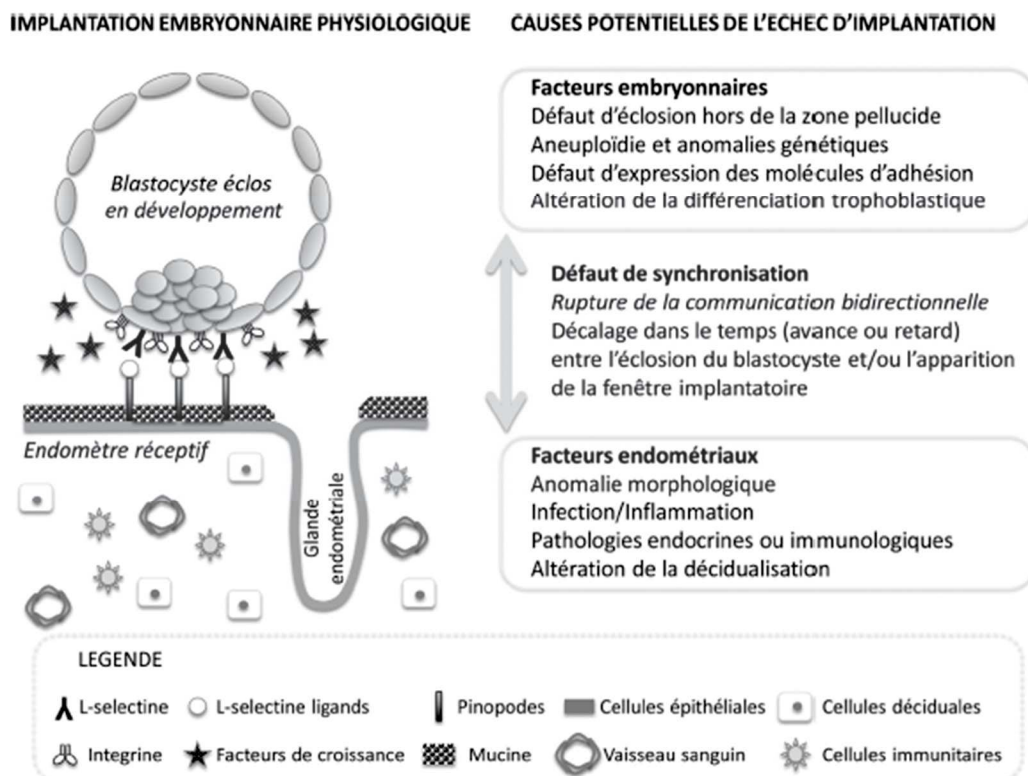


Fig. 1. Implantation embryonnaire physiologique et causes potentielles de l'échec d'implantation.

morphologie de l'endomètre en triple feuillet sur les taux de succès en AMP semble plus discutable [19]. Des études supplémentaires restent nécessaires pour déterminer l'intérêt clinique de ces critères dans la prise en charge en AMP des couples infertiles.

## 2.2. Par microscopie

L'évaluation de la réceptivité endométriale par microscopie est une approche invasive qui nécessite la réalisation d'une biopsie endométriale. L'utilisation de cette approche n'est pas systématique en pratique clinique.

La datation de l'endomètre selon ses caractéristiques histologiques évaluées par les critères de Noyes est peu utilisée à cause de la faible efficacité diagnostique de ces critères, ainsi que de leurs fortes variabilités intra/inter-individuelles et intra/inter-observateurs [26]. En revanche, la présence et la quantification du nombre de pinopodes par microscopie électronique semblent être une piste intéressante [27]. En effet, la présence de plus de 85 pinopodes sur 150 cellules épithéliales comptées pendant la fenêtre implantaire semble significativement associée à des chances de grossesses cliniques augmentées lors du cycle de FIV suivant (77,57 % versus 33,47 % ;  $p < 0,001$ ) [27]. De plus, un transfert embryonnaire personnalisé le jour présentant le nombre maximal de pinopodes permettait d'augmenter les taux de grossesses cliniques par quatre (8,11 % versus 33,82 % ;  $p = 0,004$ ) chez des patientes sujettes aux échecs d'implantation à répétition<sup>5</sup> [27]. La morphologie des pinopodes semble également importante, avec des taux significativement augmentés d'implantation embryonnaire (63,0 % versus 46,7 % ,  $p = 0,046$ ) et de grossesses cliniques (82,3 % versus 53,3 % ,  $p = 0,001$ ) pour les patientes présentant un score élevé de

pinopodes en développement complet [13]. Malgré ces résultats prometteurs, l'apport de la quantification et de l'évaluation morphologique des pinopodes est à ce jour limité en pratique clinique à cause de la fastidiosité et de la subjectivité de cette approche [13].

## 3. Les approches innovantes

### 3.1. Analyse immunologique

L'endomètre doit devenir immunotolérant pour accueillir un blastocyste semi-allogénique. Dans l'endomètre, 65 à 70 % des cellules immunitaires présentes pendant la fenêtre d'implantation sont des cellules uNK qui participent à la sécrétion de cytokines impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire et de l'angiogenèse [28–30]. L'équipe du Dr. Nathalie Lédée a développé un test d'évaluation du profil immunitaire (MatriceLab<sup>®</sup>) à partir de biopsies endométriales prélevées au moment de la fenêtre implantaire théorique chez des patientes prises en charge pour infertilité masculine (Tableau 1). L'équipe a rapporté que la majorité (81,7 % [322/394]) des patientes infertiles sujettes aux échecs d'implantation à répétition<sup>6</sup> présentaient un système immunitaire endométriale anormal pendant la fenêtre d'implantation théorique en comparaison aux patientes prises en charge pour infertilité masculine, avec 56,6 % des patientes présentant une sur-activation et 25 % une sous-activation du système immunitaire [28]. En cas de sur-activation immunitaire, des traitements

<sup>5</sup> Définis par un antécédent d'au moins deux échecs d'implantation.

<sup>6</sup> Définis par l'absence de grossesse suite au transfert cumulé d'au moins 6 embryons à 3 ou 5 jours de développement sans grossesse évolutive (évaluée 10 semaines après le transfert embryonnaire) dans le cadre d'une prise en charge intraconjugale en FIV ou ICSL.



**Tableau 1**  
Analyse immunologique : critères d'interprétation du test Matricelab®.

	Interprétation	
	Sous-activation	Sur-activation
Expression relative en ARNm IL18/TWEAK	Ratio < 0,03	Ratio > 0,12
Nombre de cellules CD56 positives	< 10	> 100
Expression relative en ARNm IL15/Fn-14	Ratio < 0,3	Ratio > 3

IL-18 est une cytokine régulant l'immunité innée et responsable du remodelage vasculaire maternel pendant la fenêtre implantatoire. TWEAK est une cytokine de la famille des TNF qui participe au contrôle de la balance immunitaire dans l'endomètre humain grâce à son récepteur Fn-14. Les cellules CD-56 positives sont représentatives de la mobilisation des cellules uNK. L'IL15 est une cytokine qui favorise la prolifération et la différenciation des cellules uNK et d'autres composants du système immunitaire dans l'endomètre et le placenta. Le Fn-14 est le reflet de la maturation des uNK et de leur activation cytotoxique. uNK : cellules utérines natural killer ; IL : interleukine ; TWEAK : TNF weak inducer of apoptosis ; Fn-14 : fibroblast growth-factor inducible molecule 14 ; CD-56 : cluster de différenciation 56.

immunorégulateurs par injection d'Intralipid® ou administration de glucocorticoïdes per os ont été proposés pour leurs propriétés immunosuppressives [31]. À ce jour, l'efficacité de ces traitements reste controversée [32,33], ce qui implique que l'évaluation de leur utilité doit se poursuivre dans le cadre des protocoles de recherche et qu'ils ne peuvent pas être proposés en pratique clinique pour l'instant [32]. En cas de sous-activation immunitaire, le « scratching » de l'endomètre a également été proposé afin de promouvoir l'inflammation locale [28]. Néanmoins, l'efficacité de cette pratique est toujours débattue [10], nécessitant également la poursuite des recherches.

### 3.2. Analyse transcriptomique

#### 3.2.1. Approche invasive

Des études ont analysé le profil transcriptomique de biopsies endométriales prélevées pendant la fenêtre implantatoire théorique et ont comparé les résultats avec ceux de biopsies endométriales prélevées pendant la phase proliférative [34–36] ou la phase sécrétoire précoce du cycle menstruel [37–43] (Tableaux 2A et 2B). Le nombre d'ARNm différenciellement exprimés dans l'endomètre est très variable au sein des études (Tableaux 2A et 2B). Les études comparant les résultats obtenus entre la phase proliférative et la fenêtre implantatoire théorique rapportent une expression majoritairement diminuée des ARNm pendant la période de réceptivité endométriale (Tableau 2A) [34,36]. Les résultats obtenus entre la phase sécrétoire précoce et la fenêtre implantatoire théorique sont hétérogènes, avec trois études rapportant une augmentation majoritaire de l'expression de certains ARNm pendant la fenêtre implantatoire [38,41,42] alors que quatre autres études ont plutôt observé une sous-expression des ARNm pendant la fenêtre d'implantatoire [37,39,40,43] (Tableau 2B). Cette disparité entre les études peut être expliquée par le fait que :

- un faible nombre de patientes ait été explorées dans certaines études ;
- différents types de puces à ADN aient été utilisés ;
- la validation par *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR) soit absente dans certaines études ;
- la majeure partie des études ait utilisé des patientes différentes dans les deux groupes étudiés.

Deux méta-analyses ont tenté de synthétiser l'ensemble des résultats disponibles [44,45]. Les deux méta-signatures rapportaient une surexpression de la majorité des transcrits différentiel-

lement exprimés pendant la fenêtre implantatoire théorique (65,6 % [40/61] et 91,2 % [52/57], respectivement [44,45]).

À ce jour, plusieurs tests basés sur une approche transcriptomique ont été décrits. Parmi ceux-ci, le Win-test® a été le premier à être publié [41]. Ce test a été développé par l'équipe du Pr Hamamah suite à l'analyse transcriptomique de biopsies endométriales réalisées chez des patientes pendant un cycle naturel au moment de la phase sécrétoire précoce (LH + 2) et de la fenêtre implantatoire théorique (LH + 7) [41]. Les patientes étaient prises en charge en ICSI pour une infertilité masculine [41]. Une signature transcriptomique de la fenêtre implantatoire a été établie et 11 ARNm ont été spécifiquement sélectionnés pour le Win-test® [41,46]. Le principe du test repose sur la quantification de ces 11 ARNm par qPCR au sein de deux biopsies endométriales prélevées à LH + 6 et à LH + 8 en cycle naturel ou à PG + 5 et à PG + 7 en cycle artificiel, permettant ainsi de diagnostiquer le statut de la fenêtre implantatoire théorique (réceptif/partiellement réceptif/non réceptif) et de choisir en conséquence le moment optimal pour la réalisation du transfert embryonnaire [4,41,46]. L'apport de ce test dans la pratique du transfert embryonnaire personnalisé pour les patientes infertiles en échec d'implantation à répétition est en cours d'évaluation.

Le test *Endometrial Receptivity Array* (ERA®) a été publié par l'équipe du Pr Carlos Simon [42]. Il est également proposé sous le nom d'ERPeak<sup>SM</sup>. Ce test a été établi après analyse des profils transcriptomiques de patientes candidates au don d'ovocytes [42]. Le test ERA® permet d'identifier le statut de réceptivité en cycle naturel (LH + 7) ou en cycle stimulé (Pg + 5) grâce à l'évaluation de l'expression de 238 ARNm [42,47]. Parmi ces ARNm, on retrouve *laminin β3* (LAMB3, *fold change* (FC) = 11,32), *microfibril associated protein 5* (MFAP5, FC = 3,42), *osteopontin* (SPP1, FC = 4,15) et interleukine 15 (IL15, FC = 3,03), 4 ARNm communs au Win-Test®. Le résultat du test ERA® s'est avéré reproductible chez sept patientes pour lesquelles deux biopsies avaient été réalisées à 29–40 mois d'intervalle au même jour du cycle menstruel, ce qui suggère une certaine stabilité intra-individuelle de la fenêtre implantatoire [48]. En revanche, un décalage dans le temps de la fenêtre implantatoire a été détecté chez certaines patientes par le test ERA®, suggérant une possible variabilité inter-individuelle de la période de réceptivité endométriale [49]. Dans l'étude de Ruiz et al. (2013), 25,9 % (22/85) des patientes en échec d'implantation à répétition<sup>7</sup> et 12 % (3/25) des patientes ayant connu au maximum un seul échec de tentative présentaient un statut « non réceptif » selon le test ERA® au moment de la fenêtre implantatoire théorique en cycle naturel ou stimulé (différence non significative entre ces deux populations) [49]. Ce statut était alors majoritairement « pré-réceptif » (84 %, 21/25), suggérant un retard dans l'apparition de la fenêtre implantatoire chez ces patientes [49]. D'autres études utilisant le test ERA® ont retrouvé ce décalage dans le temps de la fenêtre implantatoire chez 18 % à 28 % des patientes souffrant d'échecs d'implantation à répétition<sup>8</sup> [50–53], suggérant la participation d'une composante endométriale dans ces échecs. La réalisation d'un transfert embryonnaire personnalisé selon les résultats du test ERA® a été proposée pour augmenter les chances de succès des tentatives de FIV (en particulier, pour les patientes confrontées aux échecs

<sup>7</sup> Défini par l'absence de grossesse suite au transfert cumulé d'au moins quatre embryons de haut grade au cours d'au moins trois tentatives chez des patientes prises en charge en FIV (≤ 40 ans) ou en don d'ovocytes (≤ 51 ans).

<sup>8</sup> Définis par l'absence de grossesse suite à ≥ 2 transferts d'embryons frais ou congelés [50] ; à ≥ 3 transferts d'embryons frais ou congelés de hauts scores morphocinétiques (intraconjugal ou don) dans un contexte d'infertilité inexplicable [51] ; à ≥ 2 transferts cumulés d'au moins 4 embryons clivés ou d'au moins deux blastocystes de hauts scores morphocinétiques [52] ; à ≥ 3 transferts d'embryons de hauts scores morphocinétiques [53].



**Tableau 2A**  
Caractéristiques et principaux résultats des études analysant les profils transcriptomiques issus de biopsies endométriales. Études comparant le profil transcriptomique de biopsies prélevées pendant la phase proliférative et la fenêtre théorique d'implantation (milieu de la phase sécrétoire).

Article	Patientes	Échantillons	Approche	Phase du cycle menstruel	Date de prélèvement (nombre de patientes)	FC (valeur seuil)		
						Sur-exprimés	Sous-exprimés	
Kao et al., 2002 [34]	Cycles normaux	Biopsies endométriales	Puces Affymetrix	Phase proliférative Jours 8–10 (n=4)	Milieu phase sécrétoire LH+8/10 (n=7)	≥ 2	156	377
Borthwick et al., 2003 [35]	Cycles normaux	Biopsies endométriales	Puces Affymetrix	Phase proliférative Jours 9–11 (pool de 5)	Milieu phase sécrétoire LH+6/8 (pool de 5)	≥ 2	90	46
Altnae et al., 2012 [36]	Fertiles	Biopsies endométriales	Puces Affymetrix	Phase proliférative Jour 7 (n=4)	Milieu phase sécrétoire LH+7 (n=4)	FDR et p < 0,05	920	1257

**Tableau 2B**  
Caractéristiques et principaux résultats des études analysant les profils transcriptomiques issus de biopsies endométriales. Études comparant le profil transcriptomique de biopsies prélevées pendant la phase sécrétoire et la fenêtre théorique d'implantation (milieu de la phase sécrétoire).

Article	Patientes	Échantillons	Approche	Phase du cycle menstruel	Date de prélèvement (nombre de patientes)	FC (valeur seuil)		
						Sur-exprimés	Sous-exprimés	
Carson et al., 2002 [37]	Fertiles	Cellules épithéliales isolées de biopsies endométriales	Puces Affymetrix	Phase sécrétoire précoce LH+2/4 (n=3)	Milieu phase sécrétoire LH+7/9 (n=3)	≥ 2	323	370
Riesewijk et al., 2003 [38]	Cycles normaux	Biopsies endométriales	Puces Affymetrix	Phase sécrétoire LH+2 (n=5)	Milieu phase sécrétoire LH+7 (n=5)	≥ 3	153	58
Mirkin et al., 2005 [39]	Fertiles	Biopsies endométriales	Puces Affymetrix	Phase sécrétoire précoce LH+3 (n=3)	Milieu phase sécrétoire LH+8 (n=5)	≥ 2	49	58
Talbi et al., 2006 [40]	Cycles normaux	Biopsies endométriales	Puces Affymetrix	Phase sécrétoire précoce (n=3)	Milieu phase sécrétoire (n=8)	≥ 1,5	1415	1463
Haozui et al., 2009 [41]	Infertilité masculine	Biopsies endométriales	Puces Affymetrix	Phase sécrétoire précoce LH+2 (n=31)	Milieu phase sécrétoire LH+7 (n=31)	≥ 2	945	67
Diaz-Gimeno et al., 2011 [42]	Fertiles	Biopsies endométriales	Puces Agilent	Phase sécrétoire précoce LH+1/3/5 (n=5/5/5)	Milieu phase sécrétoire LH+7 (n=5)	≥ 3	143	95
Hu et al., 2014 [43]	Cycles normaux	Biopsies endométriales	Séquençage illumina	Phase sécrétoire précoce LH+2 (n=3)	Milieu phase sécrétoire LH+7 (n=3)	> 2 (p < 0,001)	1099	1273

FC : fold change ; FDR : false discovery rate ; LH : hormone lutéinisante.

d'implantation à répétition), mais l'apport de ces tests reste toujours controversé à ce jour [50,51].

Un troisième test intitulé *Endometrial Receptivity (ER) map*<sup>®</sup>/*ER grade*<sup>®</sup> a été développé suite à la sélection de 40 transcrits présentant des différentiels d'expression majeurs entre LH + 2 et LH + 7 au sein de biopsies de patientes donneuses d'ovocytes en cycle naturel [54]. Ce test semble donner des résultats similaires à ceux du test ERA<sup>®</sup> avec une concordance de 100% pour les biopsies provenant des patientes fertiles en cycle naturel entre LH + 2 et LH + 7 ; ainsi qu'une concordance comprise entre 91,7 % et 97,6 % pour les biopsies prélevées à PG + 5 chez des patientes infertiles en cycle stimulé [54]. La supériorité de ce test par rapport au test ERA<sup>®</sup>, ainsi que l'apport de son utilisation dans l'amélioration des taux de succès en AMP reste à évaluer.

### 3.2.2. Approche non invasive

Les profils transcriptomiques issus de sécrétions endométriales prélevées par lavage avec une solution saline chez des femmes fertiles au cours du cycle menstruel ont été publiés [55]. Au total, 245 ARNm se sont révélés différentiellement exprimés pendant la fenêtre théorique d'implantation, dont 126 transcrits en surexpression ( $FC \geq 4$ ,  $q < 0,05$ ) [55]. Des études supplémentaires sont encore nécessaires afin de déterminer l'intérêt clinique de cette approche dans la personnalisation de la prise en charge en AMP des couples infertiles.

### 3.3. Analyse protéomique

#### 3.3.1. Approche invasive

La spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence plusieurs profils protéomiques issus de biopsies endométriales prélevées en phase proliférative [56–59] ou sécrétoire précoce [46,60,61] en comparaison à la fenêtre implantatoire théorique. Plusieurs centaines de candidats différentiellement exprimés pendant la fenêtre implantatoire théorique ont été identifiés dans l'ensemble de ces études mais l'intérêt diagnostique de ces profils reste à évaluer en clinique.

#### 3.3.2. Approche non invasive

L'analyse des sécrétions utérines au début de la phase sécrétoire et pendant la fenêtre implantatoire théorique chez des femmes fertiles a permis de détecter la présence de 600 à 1500 protéines sécrétées dans le fluide utérin, dont 82 [62] à 367 protéines [63] différentiellement exprimées. Parmi ces protéines, un panel de 4 protéines (récepteur à la progestérone [PGR], nicotinamide N-méthyltransferase [NNMT], transporteur de sulfate [SLC26A2] et de la lipocaline 2 [LCN2]) permettrait de diagnostiquer efficacement la fenêtre implantatoire théorique avec une sensibilité et une spécificité à 91,7 % pour ces deux indicateurs [63]. Des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'apport de cette approche en AMP.

### 3.4. Analyse du miRNome

À ce jour, plus de 2500 miRNA ont été décrits dans l'espèce humaine [64]. Ces petits ARN non codants participent à la régulation de l'expression des gènes [64] et sont impliqués dans tous les processus cellulaires humains avec un large potentiel en tant que biomarqueurs diagnostiques [65].

#### 3.4.1. Approche invasive

Concernant l'expression des miRNA dans des biopsies endométriales, cinq études ont évalué leurs variations entre la fenêtre implantatoire théorique et la phase proliférative [9,66] ou la phase sécrétoire précoce [64,67,68] (Tableau 3). La surexpression de deux miRNAs, le miR-30B et miR-30D, a été rapportée pendant la fenêtre

**Tableau 3**  
Caractéristiques et principaux résultats des études analysant les profils miRNA des biopsies endométriales.

Article	Patientes	Nombre d'échantillons	Échantillons	Approche	Phase du cycle menstruel	Date de prélèvement (nombre de patientes)	Nombre de miRNA	
							Sur-exprimés	Sous-exprimés
Kuokkanen et al., 2010 [66]	Fertiles	8	Cellules épithéliales isolées de biopsies endométriales	Puces miRNA	Phase proliférative tardive Jour 12 ± 1 (n=4)	Milieu phase sécrétoire Jour 21 ± 2 (n=4)	12	12
Sha et al., 2011 [67]	Infertiles	5	Biopsies endométriales	Séquençage haut débit	Début phase sécrétoire LH+2 (1 pool de 5)	Milieu phase sécrétoire LH+7 (1 pool de 5)	8	12
Altmäe et al., 2013 [68]	Fertiles	7	Biopsies endométriales	Puces miRNA	Début phase sécrétoire LH+2 (n=4)	Milieu phase sécrétoire LH+7 (n=3)	2	2
Kresowik et al., 2014 [9]	Fertiles	12	Biopsies endométriales	RT-qPCR de 8 miRNA sélectionnés	Phase proliférative Jour 7-10 (n=12)	Milieu phase sécrétoire Jour 20-24 (n=12)	4	2
Rekker et al., 2018 [64]	Fertiles	37	Biopsies endométriales	Séquençage haut débit	Début phase sécrétoire LH+2 ± 1 (n=37)	Milieu phase sécrétoire LH+8 ± 1 (n=37)	42	49

RT-qPCR : reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction ; LH : hormone lutéinisante.



d'implantatoire théorique dans ces cinq études. Le miR-30D serait un candidat particulièrement intéressant pour son expression privilégiée au sein des cellules épithéliales endométriales et son effet stimulant sur l'expression de certains gènes de prolifération cellulaire [69].

#### 3.4.2. Approche non invasive

Le miRNA-30D a également été décrit comme surexprimé dans les sécrétions endométriales pendant la fenêtre implantatoire théorique [70]. Au total, Grasso et al. ont rapporté l'expression différentielle de 21 miRNAs en cycle naturel entre LH + 0 et LH + 7, ainsi que de 97 miRNA en cycle stimulé entre P + 0 et P + 5 dans les sécrétions utérines de femmes fertiles [71], mais aucun de ces candidats n'a été pour l'instant évalué en pratique clinique [63].

## 4. Discussion

À ce jour, la littérature semble avoir mis en évidence l'existence d'une altération ou d'un décalage dans le temps de la fenêtre implantatoire chez certaines patientes [49–53]. Pour autant, l'apport de l'utilisation ciblée des tests de réceptivité endométriales reste toujours controversé [50,51]. Les résultats disponibles à ce jour dans la littérature doivent être interprétés avec prudence car les publications présentent plusieurs biais.

Premièrement, ces études présentent des biais de sélection. En effet, les autres causes embryonnaires ou endométriales associées aux échecs d'implantation sont rarement recherchées dans la population de référence et la population étudiée. En particulier, le statut génétique des embryons transférés est absent dans la majorité des études, alors que l'aneuploïdie embryonnaire représente une cause majeure des échecs d'implantation [14,15]. Ce biais peut s'expliquer en partie par l'interdiction en vigueur dans plusieurs pays de réaliser un diagnostic génétique des aneuploïdies sur les embryons pré-implantatoires destinés à être transférés en pratique clinique [72]. Le développement de modèles *in vitro* pertinents d'implantation embryonnaire humaine permettrait de contourner partiellement cette problématique. De plus, les autres facteurs maternels impliqués dans les échecs d'implantation (Fig. 1) sont peu recherchés et/ou décrits dans les articles. Les données sont également rarement ajustées pour d'autres facteurs confondants majeurs de l'échec d'implantation, tels que le tabac ou l'indice de masse corporelle maternelle [73,74]. Pour finir, les études publiées sont principalement observationnelles ou rétrospectives et présentent un faible nombre de patients inclus. Ainsi, l'ensemble de ces limites menace la fiabilité des données obtenues, aboutissant à des résultats de faible niveau de preuve.

Deuxièmement, les auteurs utilisent souvent la fenêtre implantatoire théorique (entre LH + 7 et LH + 11) et non l'obtention d'une grossesse ou d'une naissance comme critère de référence, ce qui fragilise la pertinence des résultats ainsi obtenus. En effet, la fenêtre implantatoire pourrait être altérée ou décalée chez au moins 10–30 % des femmes, y compris chez celles considérées comme présentant une fonction utérine optimale [49–53]. Ainsi, seule la survenue d'une grossesse évolutive ou d'une naissance vivante permettrait d'attester incontestablement de la présence de la fenêtre implantatoire. De ce fait, les approches invasives ont un intérêt limité car la biopsie endométriale ne peut être réalisée sur le même cycle que celui du transfert embryonnaire à cause de son caractère délétère sur l'implantation [75]. En revanche, le développement des approches non invasives est prometteur dans l'identification de nouveaux critères diagnostiques ou prédictifs robustes de la fenêtre implantatoire, car ils permettent d'être évalués sur le cycle du transfert embryonnaire et peuvent donc ainsi être directement analysés en fonction de l'issue clinique et de la santé materno-fœtale.

Troisièmement, la frontière entre une réceptivité endométriale « saine » et « altérée » reste encore floue. En effet, les échecs d'implantation sont fréquents, y compris chez les couples fertiles [5]. Certains auteurs rapportent l'existence d'échecs d'implantation « physiologiques » suite au rejet d'embryons aneuploïdes ou peu évolutifs par l'endomètre grâce à la diminution de la sécrétion de facteurs pro-implantatoires par les cellules stromales endométriales en réponse à leur contact [5,76]. Ainsi, la survenue d'un échec d'implantation ne devrait pas forcément être considéré comme pathologique, ce qui soulève la nécessité de définir un seuil clinique. Plusieurs définitions de l'échec d'implantation à répétition sont utilisées dans les publications [6], mais aucune ne fait aujourd'hui clairement consensus [77]. La prise en compte de plusieurs facteurs semble pertinente comme l'âge maternel (des ovocytes mais pas de l'utérus), le nombre de transferts, les scores morphocinétiques et la ploïdie des embryons transférés [77]. Pour autant, les échecs d'implantation sont difficiles à vivre pour tous les patients. Environ 50–60 % des couples se découragent et arrêtent définitivement leur parcours en FIV après l'échec de deux à trois cycles, y compris en cas de prise en charge financière par l'employeur ou le gouvernement [78]. Ainsi, l'utilisation de tests efficaces de la réceptivité endométriale dès les premiers cycles de FIV pourrait également présenter un intérêt. En effet, l'identification en amont des cycles peu favorables sur le plan implantatoire permettrait de congeler les embryons en vue d'un transfert différé et de diminuer ainsi le nombre de transferts, participant à la réduction du stress des patients, de la charge de travail pour l'équipe clinico-biologique et d'une partie des dépenses publiques pour la société [77].

## 5. Conclusion

L'altération ou le décalage dans le temps de la fenêtre implantatoire pourraient être associés à certains échecs d'implantation en AMP. L'évaluation de la réceptivité endométriale par des méthodes conventionnelles comme l'échographie montre ses limites en pratique clinique. De nouvelles approches invasives et non invasives sont actuellement évaluées en recherche, contribuant ainsi à l'amélioration des connaissances sur l'implantation embryonnaire humaine. À ce jour, la fiabilité des tests de réceptivité endométriale ne fait pas consensus dans la communauté scientifique et leur place dans la prise en charge en AMP reste controversée, c'est pourquoi leur utilisation en pratique clinique n'est soutenue à ce jour par aucune recommandation officielle. Seule la réalisation d'essais cliniques randomisés de large échelle permettra de définir leurs indications potentielles en AMP et d'élaborer une conduite à tenir clinique claire quant à leur utilisation dans le cadre des transferts embryonnaires personnalisés.

## Financements

Gédeon Richter, Inserm U1203, université de Montpellier.

## Déclaration de liens d'intérêts

L'ensemble des auteurs déclare travailler activement sur le développement de tests d'évaluation de la réceptivité endométriale chez l'humain, en particulier, sur le Win Test<sup>®</sup>.

## Références

- [1] Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update* 2015;21(4):411–26.



- [2] Rapport médical et scientifique 2017 – AMP [Internet]; 2020 [cité 31 janv 2020]. Disponible sur : <https://rams.agence-biomedecine.fr/assistance-medecale-la-procreation>.
- [3] Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demiroz A, Gurgan T, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online* 2014;28(1):14–38.
- [4] Messaoudi S, El Kasmi I, Bourdieu A, Crespo K, Bissonnette L, Le Saint C, et al. 15 years of transcriptomic analysis on endometrial receptivity: what have we learnt? *Fertil Res Pract* 2019;5:9.
- [5] Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med* 2013;11:154.
- [6] Valdes CT, Schutt A, Simon C. Implantation failure of endometrial origin: is it not pathology, but our failure to synchronize the developing embryo with a receptive endometrium. *Fertil Steril* 2017;108(1):15–8.
- [7] Lessey BA. Assessment of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2011;96(3):522–9.
- [8] Paulson RJ. Hormonal induction of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2011;96(3):530–5.
- [9] Kresowik JK, Devor EJ, Van Voorhis BJ, Leslie KK. MicroRNA-31 is significantly elevated in both human endometrium and serum during the window of implantation: a potential biomarker for optimum receptivity. *Biol Reprod* 2014;91(1):17.
- [10] Sar-Shalom Nahshon C, Sagi-Dain L, Wiener-Megnazi Z, Dirnfeld M. The impact of intentional endometrial injury on reproductive outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2019;25(1):95–113.
- [11] Ochoa-Bernal MA, Fazlebas AF. Physiologic events of embryo implantation and decidualization in human and non-human primates. *Int J Mol Sci* 2020;21(6):1973.
- [12] Rarani FZ, Borhani F, Rashidi B. Endometrial pinopode biomarkers: molecules and microRNAs. *J Cell Physiol* 2018;233(12):9145–58.
- [13] Jin XY, Zhao LJ, Luo DH, Liu L, Dai YD, Hu XX, et al. Pinopode score around the time of implantation is predictive of successful implantation following frozen embryo transfer in hormone replacement cycles. *Hum Reprod Oxf Engl* 2017;32(12):2394–403.
- [14] Victor AR, Tyndall JC, Brake AJ, Lepkowsky LT, Murphy AE, Griffin DK, et al. One hundred mosaic embryos transferred prospectively in a single clinic: exploring when and why they result in healthy pregnancies. *Fertil Steril* 2019;111(2):280–93.
- [15] Munné S, Spinella F, Grifo J, Zhang J, Beltran MP, Fragouli E, et al. Clinical outcomes after the transfer of blastocysts characterized as mosaic by high resolution next generation sequencing – further insights. *Eur J Med Genet* 2020;63(2):103741.
- [16] Munné S, Kaplan B, Frattarelli JL, Child T, Nakhuda G, Shamma FN, et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good-prognosis patients: a multicenter randomized clinical trial. *Fertil Steril* 2019;112(6):1071–1079.e7.
- [17] Friedenthal J, Maxwell SM, Tiegs AW, Besser AG, McCaffrey C, Munné S, et al. Clinical error rates of next generation sequencing and array comparative genomic hybridization with single thawed euploid embryo transfer. *Eur J Med Genet* 2020;63(5):103852.
- [18] Wang A, Lathi R, Kort J, Westphal L. Anti-Müllerian hormone in association with euploid embryo transfer outcomes. *Reprod Biomed Online* 2019;39(4):609–16.
- [19] Craciunas L, Gallos I, Chu J, Boume T, Quenby S, Brosens JJ, et al. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2019;25(2):202–23.
- [20] Liu KE, Hartman M, Hartman A. Management of thin endometrium in assisted reproduction: a clinical practice guideline from the Canadian Fertility and Andrology Society. *Reprod Biomed Online* 2019;39(1):49–62.
- [21] Liu KE, Hartman M, Hartman A, Luo Z-C, Mahutte N. The impact of a thin endometrial lining on fresh and frozen-thaw IVF outcomes: an analysis of over 40,000 embryo transfers. *Hum Reprod Oxf Engl* 2018;33(10):1883–8.
- [22] Mahajan N, Sharma S. The endometrium in assisted reproductive technology: how thin is thin? *J Hum Reprod Sci* 2016;9(1):3–8.
- [23] Wang J, Xia F, Zhou Y, Wei X, Zhuang Y, Huang Y. Association between endometrial/subendometrial vasculature and embryo transfer outcome: a meta-analysis and subgroup analysis. *J Ultrasound Med* 2018;37(1):149–63.
- [24] Swierkowski-Blanchard N, Boitrelle F, Alter L, Selva J, Quibel T, Torre A. Uterine contractility and elastography as prognostic factors for pregnancy after intra-uterine insemination. *Fertil Steril* 2017;107(4):961–968.e3.
- [25] Chung CHS, Wong AWY, Chan CPS, Saravelos SH, Kong GWS, Cheung LP, et al. The changing pattern of uterine contractions before and after fresh embryo transfer and its relation to clinical outcome. *Reprod Biomed Online* 2017;34(3):240–7.
- [26] Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, Lessey BA, Novotny DB, Ireland K, et al. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril* 2004;81(5):1333–43.
- [27] Qiong Z, Jie H, Yonggang W, Bin X, Jing Z, Yanping L. Clinical validation of pinopode as a marker of endometrial receptivity: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2017;108(3):513–517.e2.
- [28] Lédée N, Petitbarat M, Chevrier L, Vitoux D, Vezmar K, Rahmati M, et al. The uterine immune profile may help women with repeated unexplained embryo implantation failure after in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol* 2016;75(3):388–401.
- [29] Jiang R, Yan G, Xing J, Wang Z, Liu Y, Wu H, et al. Abnormal ratio of CD57+ cells to CD56+ cells in women with recurrent implantation failure. *Am J Reprod Immunol* 2017;78(5). <http://dx.doi.org/10.1111/aji.12708>.
- [30] Lédée N, Munaut C, Sérazin V, Perrier d'Hauterive S, Lombardelli L, Logiodice F, et al. Performance evaluation of microbead and EUSA assays for follicular G-CSF: a non-invasive biomarker of oocyte developmental competence for embryo implantation. *J Reprod Immunol* 2010;86(2):126–32.
- [31] Lédée N, Vasseur C, Petitbarat M, Chevrier L, Vezmar K, Dray G, et al. Intralipid® may represent a new hope for patients with reproductive failures and simultaneously an over-immune endometrial activation. *J Reprod Immunol* 2018;130:18–22.
- [32] Achilli C, Duran-Retamal M, Saab W, Serhal P, Seshadri S. The role of immunotherapy in in vitro fertilization and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2018;110(6):1089–100.
- [33] Singh N, Davis AA, Kumar S, Kriplani A. The effect of administration of intravenous intralipid on pregnancy outcomes in women with implantation failure after IVF/ICSI with non-donor oocytes: a randomised controlled trial. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2019;240:45–51.
- [34] Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, et al. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002;143(6):2119–38.
- [35] Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC, et al. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2003;9(1):19–33.
- [36] Altmäe S, Reimand J, Hovatta O, Zhang P, Kere J, Laisk T, et al. Research resource: interactome of human embryo implantation: identification of gene expression pathways, regulation, and integrated regulatory networks. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2012;26(1):203–17.
- [37] Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vemon M, et al. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod* 2002;8(9):871–9.
- [38] Riesewijk A, Martin J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, et al. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003;9(5):253–64.
- [39] Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Conca A, Diaz JI, Williams S, et al. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod Oxf Engl* 2005;20(8):2104–17.
- [40] Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, et al. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006;147(3):1097–121.
- [41] Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, et al. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod Oxf Engl* 2009;24(1):198–205.
- [42] Diaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alamá P, Pellicer A, et al. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril* 2011;95(1):50–60.e1–15.
- [43] Hu S, Yao G, Wang Y, Xu H, Ji X, He Y, et al. Transcriptomic changes during the pre-receptive to receptive transition in human endometrium detected by RNA-Seq. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(12):E2744–53.
- [44] Tapia A, Vilos C, Marín JC, Croxatto HB, Devoto L. Bioinformatic detection of E47, E2F1 and SREBP1 transcription factors as potential regulators of genes associated to acquisition of endometrial receptivity. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2011;9:14.
- [45] Altmäe S, Koel M, Vösa U, Adler P, Suhonutšenko M, Laisk-Podar T, et al. Meta-signature of human endometrial receptivity: a meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers. *Sci Rep* 2017;7(1):10077.
- [46] Bissonnette L, Drissenek L, Antoine Y, Tiers L, Hirtz C, Lehmann S, et al. Human S100A10 plays a crucial role in the acquisition of the endometrial receptivity phenotype. *Cell Adhes Migr* 2016;10(3):282–98.
- [47] Garrido-Gómez T, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Vilella F, Simón C. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertil Steril* 2013;99(4):1078–85.
- [48] Díaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Bosch N, Martínez-Conejero JA, Alamá P, et al. The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2013;99(2):508–17.
- [49] Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F, et al. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2013;100(3):818–24.
- [50] Tan J, Kan A, Hitkari J, Taylor B, Tallon N, Warraich G, et al. The role of the endometrial receptivity array (ERA) in patients who have failed euploid embryo transfers. *J Assist Reprod Genet* 2018;35(4):683–92.
- [51] Patel JA, Patel AJ, Banker JM, Shah SI, Banker MR. Personalized embryo transfer helps in improving in vitro fertilization/ICSI outcomes in patients with recurrent implantation failure. *J Hum Reprod Sci* 2019;12(1):59–66.
- [52] Mahajan N. Endometrial receptivity array: clinical application. *J Hum Reprod Sci* 2015;8(3):121–9.
- [53] Hashimoto T, Koizumi M, Doshida M, Toya M, Sagara E, Oka N, et al. Efficacy of the endometrial receptivity array for repeated implantation failure in Japan: a retrospective, two-centers study. *Reprod Med Biol* 2017;16(3):290–6.
- [54] Enciso M, Carrascosa JP, Sarasa J, Martínez-Ortiz PA, Munné S, Horcajadas JA, et al. Development of a new comprehensive and reliable endometrial recep-



- tivity map (ER Map/ER Grade) based on RT-qPCR gene expression analysis. *Hum Reprod Oxf Engl* 2018;33(2):220–8.
- [55] Chan C, Virtanen C, Winegarden NA, Colgan TJ, Brown TJ, Greenblatt EM. Discovery of biomarkers of endometrial receptivity through a minimally invasive approach: a validation study with implications for assisted reproduction. *Fertil Steril* 2013;100(3):810–7.
- [56] DeSouza L, Diehl G, Yang ECC, Guo J, Rodrigues MJ, Romaschin AD, et al. Proteomic analysis of the proliferative and secretory phases of the human endometrium: protein identification and differential protein expression. *Proteomics* 2005;5(1):270–81.
- [57] Chen JC, Hannan NJ, Mak Y, Nicholls PK, Zhang J, Rainczuk A, et al. Proteomic characterization of midproliferative and midsecretory human endometrium. *J Proteome Res* 2009;8(4):2032–44.
- [58] Parmar T, Gadkar-Sable S, Savardekar L, Katkam R, Dhama S, Meherji P, et al. Protein profiling of human endometrial tissues in the midsecretory and proliferative phases of the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2009;92(3):1091–103.
- [59] Rai P, Kota V, Sundaram CS, Deendayal M, Shivaji S. Proteome of human endometrium: identification of differentially expressed proteins in proliferative and secretory phase endometrium. *Proteomics Clin Appl* 2010;4(1):48–59.
- [60] Li J, Tan Z, Li M, Xia T, Liu P, Yu W. Proteomic analysis of endometrium in fertile women during the pre-receptive and receptive phases after luteinizing hormone surge. *Fertil Steril* 2011;95(3):1161–3.
- [61] Domínguez F, Garrido-Gómez T, López JA, Camafeita E, Quiñero A, Pellicer A, et al. Proteomic analysis of the human receptive versus non-receptive endometrium using differential in-gel electrophoresis and MALDI-MS unveils stathmin 1 and annexin A2 as differentially regulated. *Hum Reprod Oxf Engl* 2009;24(10):2607–17.
- [62] Scotchie JG, Fritz MA, Mocanu M, Lessey BA, Young SL. Proteomic analysis of the luteal endometrial secretome. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif* 2009;16(9):883–93.
- [63] Kasvandik S, Saarma M, Kaart T, Rooda I, Velthut-Meikas A, Ehrenberg A, et al. Uterine fluid proteins for minimally invasive assessment of endometrial receptivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2020;105(1):dgz019.
- [64] Rekker K, Altmäe S, Suhorutshenko M, Peters M, Martínez-Blanch JF, Codoñer FM, et al. A two-cohort RNA-seq study reveals changes in endometrial and blood mimome in fertile and infertile women. *Genes* 2018;9(12):574.
- [65] Paul ABM, Sadek ST, Mahesan AM. The role of microRNAs in human embryo implantation: a review. *J Assist Reprod Genet* 2019;36(2):179–87.
- [66] Kuolkkanen S, Chen B, Ojalvo L, Benard L, Santoro N, Pollard JW. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biol Reprod* 2010;82(4):791–801.
- [67] Sha A-G, Liu J-L, Jiang X-M, Ren J-Z, Ma C-H, Lei W, et al. Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing. *Fertil Steril* 2011;96(1):150–155.e5.
- [68] Altmäe S, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Ruiz-Alonso M, Stavreus-Evers A, Horcajadas JA, et al. MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif* 2013;20(3):308–17.
- [69] Moreno-Moya JM, Vilella F, Martínez S, Pellicer A, Simón C. The transcriptomic and proteomic effects of ectopic overexpression of miR-30d in human endometrial epithelial cells. *Mol Hum Reprod* 2014;20(6):550–66.
- [70] Vilella F, Moreno-Moya JM, Balaguer N, Grasso A, Hereno M, Martínez S, et al. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the preimplantation embryo and might modify its transcriptome. *Dev Camb Eng* 2015;142(18):3210–21.
- [71] Grasso A, Navarro R, Balaguer N, Moreno I, Alama P, Jimenez J, et al. Endometrial liquid biopsy provides a miRNA roadmap of the secretory phase of the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;105(3).
- [72] Frydman N. [Increase the chances of IVF success with preimplantation genetic diagnosis of aneuploidies (PGD-A): myth or reality?] *Med Sci MS* 2016;32(2):139–40.
- [73] Semondade N, Huberlant S, Bourhis-Lefebvre V, Arbo E, Gallot V, Colombani M, et al. Female obesity is negatively associated with live birth rate following IVF: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2019;25(4):439–51.
- [74] Minguez-Alarcón L, Chavarro JE, Gaskins AJ. Caffeine, alcohol, smoking, and reproductive outcomes among couples undergoing assisted reproductive technology treatments. *Fertil Steril* 2018;110(4):587–92.
- [75] van Hoogenhuyze NE, Kasius JC, Broekmans FJM, Bosteels J, Torrance HL. Endometrial scratching prior to IVF: does it help and for whom? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Open* 2019;2019(1):hoy025.
- [76] Teklenburg G, Salker M, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanpong T, et al. Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation. *PLoS One* 2010;5(4):e10258.
- [77] Moustafa S, Young SL. Diagnostic and therapeutic options in recurrent implantation failure. *F1000 Faculty Rev* 2008;2008:9.
- [78] Boivin J, Griffiths E, Venetis CA. Emotional distress in infertile women and failure of assisted reproductive technologies: meta-analysis of prospective psychosocial studies. *BMJ* 2011;342:d223.

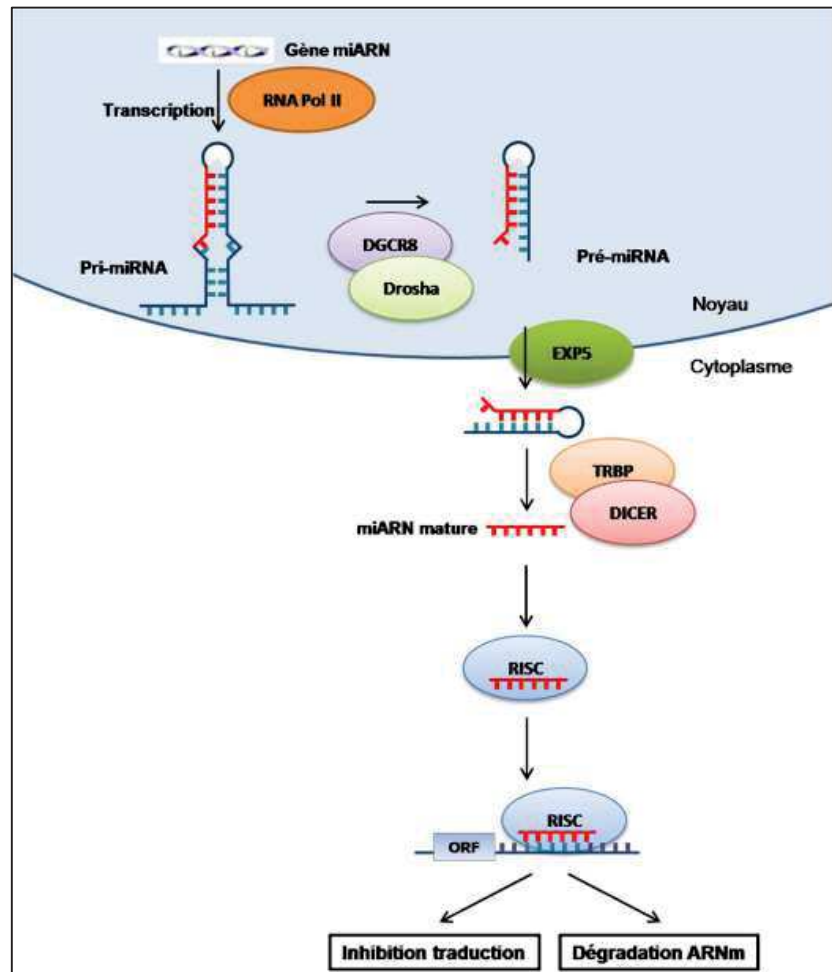
A ce jour, la survenue, la durée et les mécanismes moléculaires associés à la fenêtre implantatoire sont peu connus. Théoriquement, cette fenêtre s'ouvre et se ferme au milieu de la phase lutéale pour une durée de 24 à 48 heures (Haouzi *et al.*, 2021) et plusieurs marqueurs de l'endomètre réceptif ont déjà été proposés (Baron *et al.*, 2021). Cependant, le moment de l'ouverture de cette fenêtre et sa durée varie entre les femmes (Galliano *et al.*, 2015; Haouzi *et al.*, 2021). Une étude a montré que 26 (Ruiz-Alonso *et al.*, 2013) à 80% (Haouzi *et al.*, 2021) des patientes présentant des échecs d'implantation répétés et 20% de la population générale avaient une fenêtre implantatoire avancée ou retardée. Un décalage de la réceptivité endométriale est estimée responsable d'un tiers des échecs d'implantation (Altmäe *et al.*, 2017; Gómez *et al.*, 2015). Ces données soulignent l'intérêt de réaliser un transfert embryonnaire personnalisé afin d'augmenter les taux de succès en FIV.

L'efficacité clinique des techniques actuelles permettant d'évaluer la réceptivité endométriale est limitée (voir revue Baron *et al.*, pages 44 à 52). De nouvelles approches innovantes ont été proposées telles que les techniques OMICS, c'est-à-dire l'analyse globale des composants d'un organisme (protéomique, génomique, transcriptomique, etc.). Plusieurs études transcriptomiques de l'endomètre humain ont permis de mettre en évidence des centaines de gènes sur- et sous-exprimés pendant la fenêtre implantatoire. Notamment, le profil transcriptomique de tissus endométriaux humains prélevés au milieu de la phase sécrétoire a été comparé au profil transcriptomique de tissus endométriaux prélevés en phase proliférative (Altmäe *et al.*, 2012; Borthwick *et al.*, 2003; Kao *et al.*, 2002) ou en début de phase sécrétoire (Carson *et al.*, 2002; Díaz-Gimeno *et al.*, 2011; Haouzi *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2014; Mirkin *et al.*, 2005; Riesewijk *et al.*, 2003; Talbi *et al.*, 2006) (voir tableaux 2A et 2B, Baron *et al.*, page 47). Parmi ces études, notre équipe de recherche a publié en 2009 la comparaison des profils transcriptomiques de tissus endométriaux prélevés chez des patientes au moment de la phase sécrétoire précoce (LH+2) et de la fenêtre implantatoire théorique (LH+7) lors d'un même cycle naturel. Cette analyse a permis de mettre en évidence une signature de 1012 transcrits, dont 94% sont sur-exprimés et 6% sont sous-exprimés pendant la fenêtre implantatoire (Haouzi *et al.*, 2009). Grâce à cette signature, les 11 transcrits les plus différentiellement sur-exprimés ont été validés comme biomarqueurs de la fenêtre implantatoire et sélectionnés comme critères diagnostiques d'un test innovant d'évaluation de la réceptivité endométriale, appelé le *Win-test*® (Baron *et al.*, 2021; Haouzi *et al.*, 2021). L'endomètre est alors qualifié de "réceptif" si l'expression moyenne des 11 gènes est supérieure à 70%, "partiellement réceptif" entre 50 et 70% et "non réceptif" si l'expression est inférieure à 50% du contrôle positif, dont l'expression

moyenne a été évaluée à 100% (Haouzi *et al.*, 2021). L'identification de la fenêtre implantatoire permet de transférer l'embryon au moment optimal et d'obtenir ainsi une synchronisation entre l'embryon en développement et l'endomètre réceptif lors d'un cycle d'embryon congelé/décongelé ultérieur. Grâce au recours à ce transfert personnalisé, le *Win-test* s'est révélé bénéfique avec une augmentation significative des taux d'implantation, de grossesse et de naissances vivantes (Haouzi *et al.*, 2021).

Ces dernières années, l'intérêt pour les microARN ou miRNA en tant que nouveaux biomarqueurs de pronostic et d'outils diagnostiques, voire thérapeutique, a largement avancé, notamment dans l'infertilité féminine (Bahmyari *et al.*, 2021).

Les miRNA sont des petits ARN non codants, d'une longueur de 19 à 25 nucléotides. A ce jour, plus de 2600 miRNA matures humains, susceptibles de réguler l'expression de plus de 60% des gènes codants, ont été identifiés (Friedman *et al.*, 2009; Plotnikova *et al.*, 2019). Les miRNA dérivent de long transcrits, synthétisés dans le noyau cellulaire. Ils subissent des modifications puis sont exportés sous forme de pré-miRNA dans le cytoplasme par la protéine exportin 5 (Van der Hauwaert *et al.*, 2015). Le brin de miRNA mature se lie alors de façon complémentaire à l'ARN messager (mRNA) cible pour former un complexe appelé RISC. Ce complexe joue un rôle de régulateur selon deux mécanismes complémentaires, soit par inhibition de la traduction des mRNA soit par l'induction de leur dégradation (*Figure 16*). Ainsi, les miRNA régulent le taux de protéines produites par le mRNA cible. Malgré leur synthèse intracellulaire, ils peuvent être exportés et se retrouver dans les fluides biologiques tels que le sérum, le plasma, le sperme ou encore les urines (Turchinovich *et al.*, 2013). Dans ce cas, ils sont protégés de la dégradation par leur liaison à des protéines nommées Argonaute (Ago1 et Ago 2), les rendant stables dans les fluides biologiques. L'identification de miRNA associés à la fenêtre implantatoire pourrait donc aboutir, à long terme à un test sanguin non invasif chez les patientes prises en charge en FIV.



**Figure 16 Mécanisme de synthèse des miRNA.** La première étape est nucléaire et permet la transcription du pri-miRNA, transformé en pré-miRNA par un complexe formé de DGCR8 et Drosha. Ce pré-miRNA est transporté dans le cytoplasme cellulaire par l'exportin 5 (EXP5) où il devient un miRNA mature grâce à un complexe formé de TRBP et DICER. Finalement, le miRNA forme un complexe RISC (RNA-induced silencing complex) multiprotéique grâce auquel il pourra jouer son rôle régulateur sur un mRNA cible en inhibant sa traduction ou en activant sa dégradation. (D'après (Van der Hauwaert *et al.*, 2015)) miARN/miRNA : micro Acides Ribonucléiques ; mRNA : Acides Ribonucléiques messagers ; RNA pol II : ARN polymérase 2

### C. Amélioration de la compétence embryonnaire

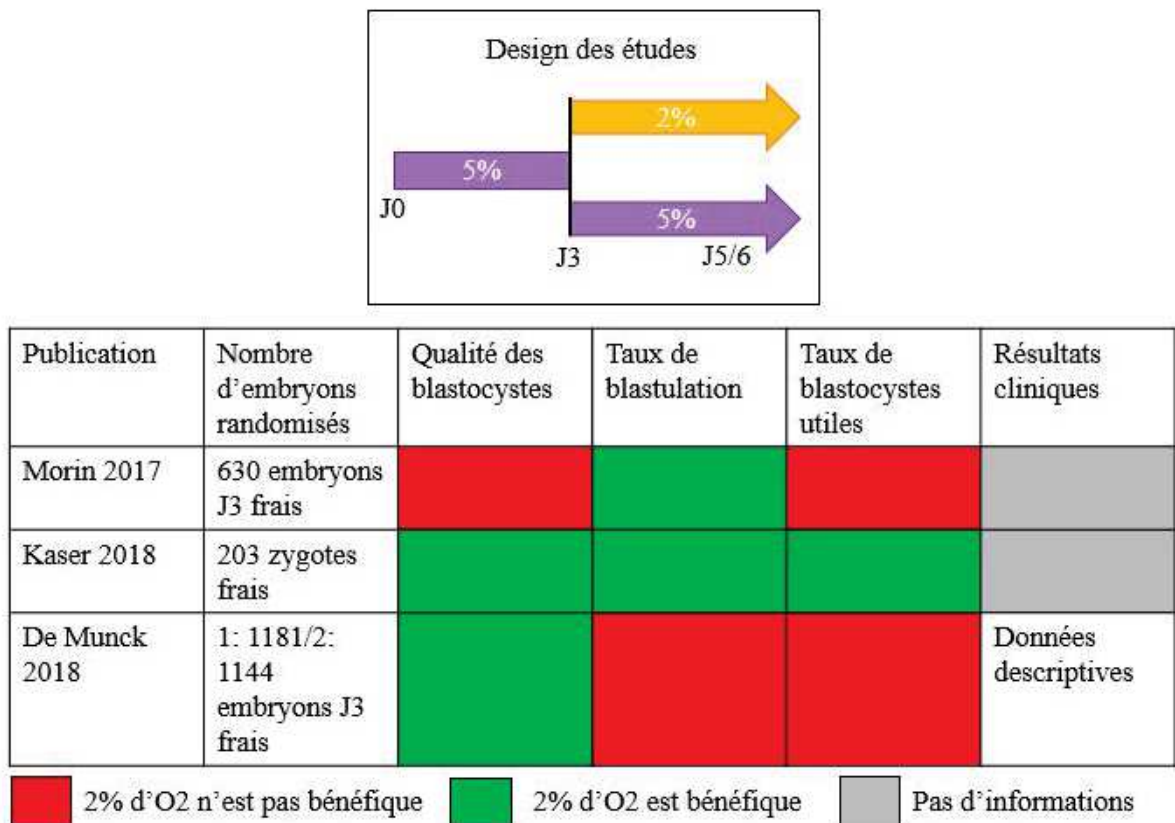
Les mécanismes d'acquisition de la compétence embryonnaire sont encore largement méconnus et son évaluation repose à ce jour essentiellement sur des critères morphologiques (Dahdouh *et al.*, 2015; Groff *et al.*, 2019). Les conditions de culture embryonnaire en laboratoire semblent participer activement à l'acquisition de la compétence embryonnaire. Récemment, plusieurs publications ont rapporté un effet positif d'une concentration séquentielle en oxygène mimant les conditions physiologiques pendant la culture *in vitro* pré-implantatoire en FIV. Physiologiquement, l'embryon produit son énergie *via* la synthèse d'ATP (Adénosine Triphosphate) à partir de pyruvate, lactate et acides aminés par phosphorylation oxydative principalement au début de son développement, puis à partir du glucose après la compaction (Houghton and Leese, 2004). Les premiers stades de développement embryonnaire se déroulent à 5% d'O<sub>2</sub> dans la trompe puis à 2% d'O<sub>2</sub> dans la cavité utérine chez l'humain (Ng *et al.*, 2018; Wale and Gardner, 2016). Ainsi, le passage de la phosphorylation oxydative à la glycolyse coïncide avec la diminution de la tension en O<sub>2</sub> de la trompe à l'utérus lors du développement embryonnaire (De Munck *et al.*, 2019; Morin, 2017).

Historiquement, la culture embryonnaire en hypoxie (5% d'O<sub>2</sub>) s'est récemment révélée bénéfique pour le développement embryonnaire humain et les résultats de la FIV en comparaison aux conditions de culture sous concentrations d'O<sub>2</sub> atmosphérique (20% d'O<sub>2</sub>) (Nastri *et al.*, 2016). L'hypothèse principale serait qu'une culture embryonnaire sous 20% d'O<sub>2</sub> entraînerait une augmentation du stress oxydatif, altérerait le transcriptome et le protéome embryonnaires, et impacterait le métabolisme et l'épigénome de l'embryon ; compromettant ainsi sa qualité et sa viabilité (Gardner and Balaban, 2016; Wale and Gardner, 2016). Durant les vingt dernières années, plusieurs études ont rapporté l'intérêt d'une culture en hypoxie pour les embryons de mammifères (Nastri *et al.*, 2016).

Récemment, trois études ont comparé l'impact de la culture monophasique à faible concentration en oxygène (5% d'O<sub>2</sub>) avec une culture biphasique (5% d'O<sub>2</sub> de J0 à J3 puis 2% d'O<sub>2</sub> de J3 à J5/J6) sur le taux de blastulation des embryons humains en FIV (De Munck *et al.*, 2019; Kaser *et al.*, 2018; Morin, 2017) (*Figure 17* et *tableau 3*). Deux études ont observé une augmentation significative des taux de blastulation lors d'une culture embryonnaire dynamique (5-2%) (Kaser *et al.*, 2018; Morin, 2017) alors que la troisième étude n'a pas montré d'effet positif de la culture séquentielle sur les taux de blastulation mais sur la qualité des blastocystes obtenus, notamment sur l'expansion du trophoblaste (De Munck *et al.*, 2019) (*Figure 17*). Une seule de ces trois études a comparé les taux de grossesse entre les deux stratégies de culture,



rapportant des taux de grossesse cliniques et de naissances légèrement supérieurs pour les patientes dont le(s) embryon(s) transféré(s) avait été cultivé en stratégie séquentielle (5-2% d'O<sub>2</sub>), tout en soulignant que ces données étaient uniquement descriptives (De Munck *et al.*, 2019) (Tableau 3).



**Figure 17 Design et principaux résultats des études comparant la culture monophasique (5%) à la culture séquentielle (5-2%) en oxygène pendant la culture embryonnaire prolongée.**

Lorsque la culture séquentielle à 5 puis 2% d'oxygène est bénéfique (en vert), la culture séquentielle était significativement supérieure à la culture monophasique pour le résultat spécifié. Lorsque la culture séquentielle n'est pas bénéfique (en rouge), les 2 stratégies de culture sont statistiquement similaires pour le résultat spécifié. Aucune des trois études n'a montré une supériorité de la stratégie monophasique comparée à la stratégie séquentielle pour les résultats présentés. J : jour ; O<sub>2</sub> : oxygène



Publication	Design de l'étude	Système de culture	Résultats																																									
Morin 2017	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Essai contrôlé randomisé</li> <li>- 670 embryons J3 humains frais aléatoirement cultivés à 2 ou 5% d'O<sub>2</sub></li> <li>- Cohorte embryonnaire de chaque patient divisée entre les 2 groupes (5 et 2%)</li> </ul>	Culture à 5% jusqu'à J3 puis culture prolongée jusqu'à J5/6 à 2 ou 5% d'O <sub>2</sub> .	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>2% O<sub>2</sub></th> <th>5% O<sub>2</sub></th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Taux de blastocystes utiles</td> <td>59%</td> <td>54,4%</td> <td>0,26</td> </tr> <tr> <td>Taux de blastulation</td> <td>74%</td> <td>66%</td> <td>&lt;0,05</td> </tr> </tbody> </table> <p>* Tests de Wilcoxon et Chi-square appliqués</p>		2% O <sub>2</sub>	5% O <sub>2</sub>	P	Taux de blastocystes utiles	59%	54,4%	0,26	Taux de blastulation	74%	66%	<0,05																													
	2% O <sub>2</sub>	5% O <sub>2</sub>	P																																									
Taux de blastocystes utiles	59%	54,4%	0,26																																									
Taux de blastulation	74%	66%	<0,05																																									
Kaser 2018	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Essai contrôlé randomisé</li> <li>- 203 zygotes 2PN/3PN</li> <li>- Zygotes d'une même cohorte attribué aléatoirement à J1 au groupe 5% ou 2%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Groupe 5% : culture à 5% d'O<sub>2</sub> de J1 à J5</li> <li>- Groupe 2% : culture à 5% d'O<sub>2</sub> de J1 à J3 puis à 2% de J3 à J5</li> </ul>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>2% O<sub>2</sub></th> <th>5% O<sub>2</sub></th> <th>AOR</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Nombre de blastocystes obtenus par embryon clivé</td> <td>40,2%</td> <td>22,5%</td> <td>2,55</td> </tr> <tr> <td>Nombre de blastocystes utiles par embryon clivé</td> <td>36,8%</td> <td>21,3%</td> <td>2,30</td> </tr> </tbody> </table>		2% O <sub>2</sub>	5% O <sub>2</sub>	AOR	Nombre de blastocystes obtenus par embryon clivé	40,2%	22,5%	2,55	Nombre de blastocystes utiles par embryon clivé	36,8%	21,3%	2,30																													
	2% O <sub>2</sub>	5% O <sub>2</sub>	AOR																																									
Nombre de blastocystes obtenus par embryon clivé	40,2%	22,5%	2,55																																									
Nombre de blastocystes utiles par embryon clivé	36,8%	21,3%	2,30																																									
Munck 2018	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Essai contrôlé randomisé</li> <li>- Etude 1 : 1181 embryons J3 aléatoirement placés à 2 ou 5%</li> <li>- Etude 2 : 1144 embryons J3 aléatoirement placés à 2 ou 5%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Culture à 5% d'O<sub>2</sub> jusqu'à J3</li> <li>- Culture prolongée jusqu'à J5/6 à 2 ou 5% d'O<sub>2</sub></li> <li>- Pré-équilibre des milieux sur la nuit précède l'incubation des embryons</li> </ul>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="3">Etude 1</th> <th colspan="3">Etude 2</th> </tr> <tr> <th>2% O<sub>2</sub></th> <th>5% O<sub>2</sub></th> <th>p</th> <th>2% O<sub>2</sub></th> <th>5% O<sub>2</sub></th> <th>p</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Taux de blastulation</td> <td>68,6%</td> <td>71,9%</td> <td>0,319</td> <td>63,6%</td> <td>64,7%</td> <td>0,758</td> </tr> <tr> <td>Blastocystes J5 de bonne qualité</td> <td>55,8%</td> <td>55,2%</td> <td>0,888</td> <td>46,9%</td> <td>48,8%</td> <td>0,554</td> </tr> <tr> <td>Taux d'utilisation</td> <td>53,1%</td> <td>53,2%</td> <td>1</td> <td>49,8%</td> <td>48,1%</td> <td>0,953</td> </tr> <tr> <td>Taux de grossesse</td> <td>59,2%</td> <td>54,5%</td> <td>#</td> <td>60,5%</td> <td>48,7%</td> <td>#</td> </tr> </tbody> </table>		Etude 1			Etude 2			2% O <sub>2</sub>	5% O <sub>2</sub>	p	2% O <sub>2</sub>	5% O <sub>2</sub>	p	Taux de blastulation	68,6%	71,9%	0,319	63,6%	64,7%	0,758	Blastocystes J5 de bonne qualité	55,8%	55,2%	0,888	46,9%	48,8%	0,554	Taux d'utilisation	53,1%	53,2%	1	49,8%	48,1%	0,953	Taux de grossesse	59,2%	54,5%	#	60,5%	48,7%	#
	Etude 1				Etude 2																																							
	2% O <sub>2</sub>	5% O <sub>2</sub>	p	2% O <sub>2</sub>	5% O <sub>2</sub>	p																																						
Taux de blastulation	68,6%	71,9%	0,319	63,6%	64,7%	0,758																																						
Blastocystes J5 de bonne qualité	55,8%	55,2%	0,888	46,9%	48,8%	0,554																																						
Taux d'utilisation	53,1%	53,2%	1	49,8%	48,1%	0,953																																						
Taux de grossesse	59,2%	54,5%	#	60,5%	48,7%	#																																						

**Tableau 3 Récapitulatif sommaire des études comparant les stratégies monophasique (5%) et séquentielle (5-2%) d'oxygène pendant la culture prolongée d'embryons humains.** L'AOR (adjust odd ratio) est une régression ajustée pour la source et l'âge des ovocytes, la technique utilisée FIVc ou ICSI, la congélation ou le transfert frais et la proportion d'embryons de bonne qualité au jour 3. Il est significatif si supérieur à 2. #, données descriptives. FIV(c) : Fécondation in vitro (conventionnelle) ; ICSI : intracytoplasmic sperm injection ; O<sub>2</sub> : oxygène ; J : jour

## RÉSULTATS

# Chapitre 1 : Nouveaux biomarqueurs d'évaluation de la réceptivité endométriale

## I. Contexte et présentation de la publication

Depuis la puberté jusqu'à la ménopause, l'endomètre subit des modifications mensuelles cycliques dans le but de se préparer à initier une grossesse. Ces dernières années, plusieurs marqueurs de la fenêtre implantatoire ont été proposés (Baron *et al.*, 2021) et certaines équipes ont proposé de nouvelles approches innovantes permettant d'évaluer le moment de l'ouverture de la fenêtre implantatoire. Notre équipe a mis au point un test innovant d'évaluation de la réceptivité endométriale, le *Win-test* (Haouzi *et al.*, 2021). Cependant, ce test nécessite de réaliser une biopsie de l'endomètre, ce qui le qualifie de méthode invasive.

L'intérêt se porte de plus en plus sur les miRNA qui peuvent constituer de potentiels biomarqueurs de diagnostic, pronostic et parfois même thérapeutique, en fertilité féminine (Bahmyari *et al.*, 2021). Nous avons donc exploré le miRNome endométrial. Alors que certaines études ont montré que l'expression des miRNA dans les tissus endométriaux variait selon les phases du cycle menstruel (Voir Table 1, Drissenek *et al.*, page 62), nous avons choisi d'étudier l'expression des miRNA endométriaux associés au statut de la réceptivité endométriale obtenu par le *Win-test* puis d'étudier l'expression des miRNA endométriaux selon les résultats de grossesse obtenus après transfert embryonnaire personnalisé suite au *Win-test* (« échec d'implantation » versus « implantation réussie ; « naissance » versus « fausse couche »). Nous avons également évalué la faisabilité de la quantification des miRNA dans la circulation sanguine, dans le but d'identifier des pistes de recherche sur la mise au point d'un test non invasif.

## II. Article 1 (Drissenek *et al.*, 2020)

## Endometrial miRNome profile according to the receptivity status and implantation failure

Loubna Drissenek<sup>a,b</sup> , Chloé Baron<sup>a,b</sup> , Sophie Brouillet<sup>a,b,c,d</sup> , Frida Entezami<sup>a,e</sup> ,  
Samir Hamamah<sup>a,b,c</sup>  and Delphine Haouzi<sup>a,b,c</sup> 

<sup>a</sup>Univ Montpellier, INSERM U1203, EmbryoPluripotency, Montpellier, France; <sup>b</sup>IRMB, Univ Montpellier, INSERM, Montpellier, France; <sup>c</sup>CHU Montpellier, ART/PDG department, Anaud de Villeneuve Hospital, Montpellier, Montpellier, France; <sup>d</sup>Univ Grenoble-Alpes, INSERM 1036, Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble (BIG), Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection (BCI), Grenoble, France; <sup>e</sup>American Hospital of Paris, IVF department, Neuilly-Sur-Seine, France

### ABSTRACT

This is a retrospective study to evaluate if the miRNome profile of endometrium samples collected during the implantation window predicts Assisted Reproduction Technology (ART) outcomes. We first investigated the endometrial miRNome profile according to the receptivity status in 20 patients with repeated implantation failures (RIF) (discovery cohort). After customized embryo transfer, the miRNome profiles of receptive patients with a positive or negative  $\beta$ -hCG, and with early miscarriage or live birth were analysed. Some differentially expressed miRNAs were selected for validation by RT-qPCR in endometrial samples from 103 RIF patients (validation cohort). Analysis of the different miRNome profiles identified endometrial receptivity, implantation failure, and early miscarriage-associated miRNA signatures that included 11, 261, and 76 miRNAs, respectively. However, only four miRNAs associated with the endometrial receptivity status (miR-455-3p and miR-4423-3p) and implantation failure (miR-152-3p and miR-155-5p) were significantly validated in endometrial samples. The miRNome profile of endometrial tissues during the implantation window can predict the pregnancy outcome. These data are crucial for opening new perspectives to predict implantation failure and consequently, to increase ART success.

### ARTICLE HISTORY

Received 30 January 2020  
Accepted 3 June 2020

### KEYWORDS

ART; miRNAs; endometrial receptivity; implantation failure; miscarriage; implantation window

### Introduction

The evaluation of endometrial receptivity is crucial in Assisted Reproduction Technology (ART) programmes. Using our human transcriptomic data (Bissonnette et al., 2016; Haouzi, Assou, et al., 2009; Haouzi, Mahmoud, et al., 2009; Haouzi et al., 2010; Haouzi et al., 2011; Haouzi et al., 2012), we previously identified genes that are specifically overexpressed in the endometrium during the implantation window and that could be potential biomarkers of endometrial receptivity. The function of endometrial receptivity biomarkers were tested in fertile patients and in an *ex vivo* model (i.e. stromal and epithelial endometrium cells) (Bissonnette et al., 2016; Haouzi, Mahmoud, et al., 2009). By using the molecular signature of these genes, we developed a diagnostic tool called Win-Test to evaluate the expression level of 11 specific biomarkers of endometrial receptivity during the

implantation window (Bissonnette et al., 2016; Hamamah & Haouzi, 2011; Haouzi et al., 2014). Currently, there are only few tests to determine the endometrial receptivity status and to indicate the best timing for frozen embryo transfer (FET) during natural or hormone-supplemented cycles (Bassil et al., 2018; Díaz-Gimeno et al., 2011; Enciso et al., 2018; Lessey & Young, 2019; Ruiz-Alonso et al., 2013). However, these approaches are invasive and require an endometrial biopsy during the implantation window. Today, one of the ART challenges is the development of non-invasive tests in relation to the endometrial receptivity and the implantation window. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA transcripts that regulate cell function by modulating the post-transcriptional activity of multiple target genes through repression of mRNA translation or regulation of mRNA degradation. The clinical benefits of miRNAs as diagnostic/prognostic biomarkers in blood and as therapeutic targets have

CONTACT Samir Hamamah  s-hamamah@chu-montpellier.fr  ART/PDG department, Anaud de Villeneuve hospital, CHU Montpellier, Montpellier, 34295, France

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2020 The British Fertility Society



been demonstrated in several diseases, including life-threatening pathologies (Backes et al., 2016; Garzon et al., 2010).

Many studies have provided evidence that miRNAs are crucial for cellular processes that occur during the cyclic endometrium changes (Bueno & Malumbres, 2011; Creighton et al., 2010; Vilella et al., 2015; Yao et al., 2009; Zhao et al., 2006, 2009). Moreover, aberrant miRNA expression has been associated with human endometrial disorders, such as endometriosis and carcinoma, and also with unexplained recurrent spontaneous miscarriage (Boren et al., 2008; Kuokkanen et al., 2010; Ohlsson Teague et al., 2009; Qin et al., 2016; Yang & Liu, 2014). In addition, certain miRNAs are circulating in blood and can be quantified in serum and plasma. The identification of endometrial receptivity-associated miRNAs in both endometrial biopsies and blood samples could open new perspectives for the development of a non-invasive endometrial receptivity test.

In contrast to several recent studies that analysed the miRNome of endometrium samples during the different phases of the cycle or according to ART

outcome (Altmäe et al., 2013; Choi et al., 2016; Kresowik et al., 2014; Kuokkanen et al., 2010; Rekker et al., 2018; Revel et al., 2011; Sha et al., 2011; C. Shi et al., 2017; Vilella et al., 2015) (Table 1), here, we performed a miRNomic study to identify miRNAs during the implantation window that are associated with the receptivity status, and then according to the pregnancy outcome (implantation failure, early embryo miscarriage, and live birth at term) after customized FET. In addition, we tested whether some of the differentially expressed miRNAs can also be detected in serum samples.

## Material and methods

### Study design and sample collection

A total of 123 infertile women (age:  $37.1 \pm 5.1$  years (mean  $\pm$  SD)) were recruited after written informed consent and approval by the Institutional Review Board of the Montpellier University Hospital (accreditation number: 198711). All women were under hormone replacement therapy (HRT) and waiting for FET after several repeated implantation failures (RIFs  $\geq 3$ ,

**Table 1.** Overview of miRNA studies on human endometrial receptivity.

Study	Patients	Number of patients	Samples	Approach	Compared samples	Number of miRNAs	
						Up	Down
Kuokkanen et al. (2010)	Fertile volunteers	8	Epithelial cells from endometrial tissue	miRNA microarrays	Late proliferative (n=4) vs. mid-secretory phase (n=4) (day 12 $\pm$ 1) (day 19–23)	12	12
Sha et al. (2011)	Infertile patients	5	Endometrial biopsies	Deep sequencing	Early proliferative vs. mid-secretory phase (1 pool of 5) (1 pool of 5) (LH + 2) (LH + 7)	8	12
Altmäe et al. (2013)	Fertile patients	7	Endometrial biopsies	miRNA microarrays	Early proliferative (n=4) vs. mid-secretory phase (n=3) (LH + 2) (LH + 7)	2	2
Kresowik et al. (2014)	Fertile patients	12	Endometrial biopsies Serum samples	RT-qPCR of 8 selected miRNAs	Proliferative (n=12) vs. secretory phase (n=12) (day 7–10) (day 20–24)	4	2
Vilella et al. (2015)	Fertile patients	20	Endometrial Fluid	miRNA microarrays	Early proliferative (n=4) vs. mid-secretory phase (n=4) (day 6–8) (day 19–23)	9	0
					Late proliferative (n=4) vs. mid-secretory phase (n=4) (day 9–14) (day 19–23)	8	0
					Early secretory (n=4) vs. mid-secretory phase (n=4) (day 15–18) (day 19–23)	1	5
					Late secretory (n=4) vs. mid-secretory phase (n=4) (day 24–28) (day 19–23)	0	4
Rekker et al. (2018)	Fertile patients	37	Endometrial biopsies	small RNA sequencing	Early secretory (n=37) vs. mid-secretory (n=37) (LH + 1/LH + 3) (LH + 7/LH + 9)	42	49
Revel et al. (2011)	Fertile and RIF patients	16	Endometrial biopsies	Taqman miRNA array	Fertile (n=5) vs. RIF patients (n=11) (day 20–24)	10	3
Choi et al. (2016)	Healthy volunteers and RIF patients	10	Endometrial biopsies	miRNA microarrays	Fertile (n=5) vs. RIF patients (n=5) (day 21)	18	17
Shi et al. (2017)	Infertile and RIF patients	12	Endometrial biopsies	miRNA microarrays	Infertile (n=5) vs. RIF patients (n=7) (5–7 days post-ovulation)	93	12
Rekker et al. (2018)	Fertile and RIF patients	73	Endometrial biopsies Blood	small RNA sequencing	Fertile (n=36) vs. RIF patients (n=37) (LH + 7–LH + 9)	8	13
					Fertile (n=39) vs. RIF patients (n=36) (LH + 7–LH + 9)	1	0
Xu et al. (2019)	Infertile and RIF patients	10	Endometrial biopsies	small RNA sequencing	Infertile (n=5) vs. RIF patients (n=5) (LH + 7)	32	54

LH: luteinizing hormone; RIF: repeated implantation failure.

mean  $\pm$  SEM:  $9.1 \pm 0.8$  previous failed attempts;  $9.8 \pm 0.7$  non-implanted embryos) after fresh embryo transfer and/or FET. HRT involved either a daily oral dose of oestradiol (6 mg; Provames 2 mg), or a progressively increasing dose of oestradiol (2 mg/day for 3 days, 4 mg/day for 5 days and then 6 mg/day) from day 1 to day 28 combined with 600–800 mg per day of progesterone (Pg; Utrogestan 200 mg) from day 15 to day 28. All patients were recruited to assess endometrial receptivity during the theoretical implantation window between Pg + 5 to Pg + 9 (Pg, progesterone) using the Win-Test (Bissonnette et al., 2016; Hamamah & Haouzi, 2011). The Win-Test measures the expression level of 11 endometrial receptivity biomarkers in endometrium biopsies by RT-qPCR (Bissonnette et al., 2016; Haouzi et al., 2014) (Supplementary Figure S1). Consequently, all FET's were performed on the day

within the implantation window when the endometrium was considered receptive according to the Win-Test results.

Among these patients with RIF, 20 (age:  $35.9 \pm 6.2$  years (mean  $\pm$  SD)) were recruited for miRNome profiling (discovery cohort). Based on the Win-Test results, they were classified in two groups: with non-receptive ( $n=5$ ) or with receptive endometrium ( $n=15$ ). After FET ( $n=15$ ), patients were classified according to the pregnancy outcome: negative  $\beta$ -hCG results ( $n=6$ ), positive  $\beta$ -hCG results (three increasing values of  $\beta$ -hCG) ( $n=9$ ), miscarriage between 8 and 12 weeks of amenorrhoea ( $n=4$ ), or live birth ( $n=5$ ) (Figure 1). Finally, the other 81 (age:  $36.9 \pm 5.1$  years (mean  $\pm$  SD)) and 22 (age:  $35 \pm 4.8$  years (mean  $\pm$  SD)) patients with RIF were recruited to validate the expression of selected miRNAs in endometrial

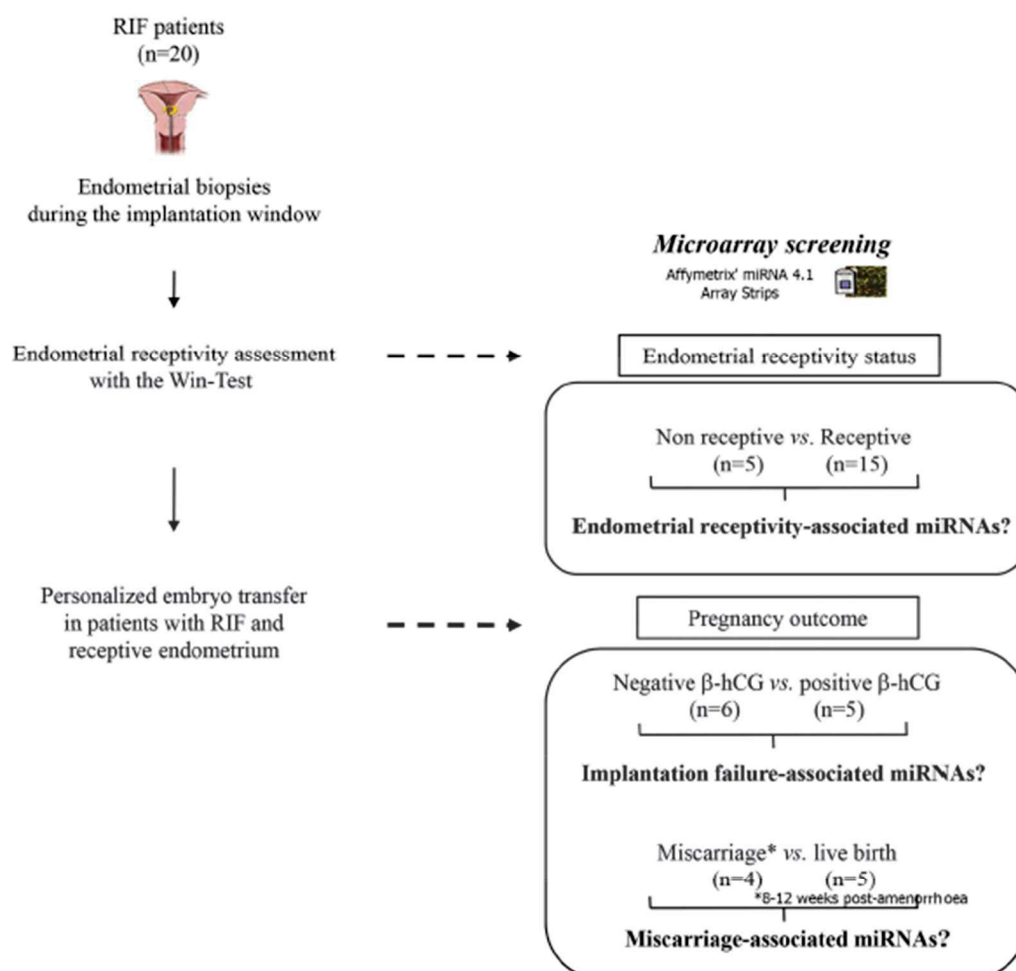


Figure 1. Endometrium sample collection and patients' classification for the miRNomic analysis. RIF: repeated implantation failure; Pg: progesterone.



samples and to test whether differentially expressed miRNAs could be detected in serum samples by quantitative RT-PCR (RT-qPCR), respectively (validation cohort).

#### *RNA extraction from endometrial biopsies*

Total RNA was extracted from endometrial biopsies with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA purity and quantity were measured with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies Inc., DE, USA). For samples used for microarray experiments, RNA integrity was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, USA). All RNA samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before use.

#### *RNA extraction from serum samples*

Serum samples were collected at the time of endometrium biopsies for endometrial receptivity assessment with the Win-Test. Total RNA was extracted using a TRIzol/miRNeasy hybrid protocol. Briefly, 800  $\mu\text{l}$  of TRIzol and 200  $\mu\text{l}$  of chloroform were added to 200  $\mu\text{l}$  of serum. After centrifugation at 12000 g at  $4^{\circ}\text{C}$  for 15 min, supernatants were transferred in tubes containing 1.5 volume equivalent of 100% ethanol. Then, the miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) was used according to the manufacturer's instructions. All samples were eluted in 30  $\mu\text{l}$  of nuclease-free water and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before use.

#### *Microarray hybridization and data analysis*

Affymetrix microarrays were processed at the Montpellier Microarray Core Facility of our hospital, CHRU-INSERM-UM Montpellier (<http://www.chu-montpellier.fr/fr/chercheurs/plateformes/les-plateformes-recherche/transcriptome/>). Total RNA (100 ng) was labelled for hybridization with Affymetrix<sup>®</sup> miRNA 4.1 Array Strips (Affymetrix, UK). Each endometrial sample was processed individually on GeneChip miRNA array strips (4 samples/strip). Scanned GeneChip images were analysed using the Affymetrix Expression Console 1.4.1 software to obtain the intensity value signal and the absent/present detection call for each probeset using the default analysis settings and global scaling as first normalization method. Probe intensities were derived using the robust multi-array analysis (RMA) algorithm.

To identify miRNAs related to endometrial receptivity, first the miRNA expression profiles of patients with non-receptive ( $n=5$ ) and receptive ( $n=15$ ) endometrium during the theoretical implantation window were compared. Then, to identify miRNAs associated with implantation failure, the miRNome profiles of receptive patients with ( $n=5$ ) and without ( $n=6$ ) pregnancy (positive  $\beta$ -hCG vs. negative  $\beta$ -hCG results) were compared. For the identification of miRNAs related to miscarriage, the endometrial miRNome of pregnant patients who delivered at term ( $n=5$ ) and of women who had a miscarriage ( $n=4$ ) were compared.

A first selection was carried out using the detection call (present in at least one endometrial sample). Then, Affymetrix expression console software was used to identify small non-coding RNAs that were differentially expressed between groups using the ANOVA test (fold change, FC  $>2$ ; false discovery rate, FDR  $<5\%$ ).

The list of differentially expressed small non-coding RNAs that were identified were submitted to Ingenuity (<http://www.ingenuity.com>) to identify the predicted target genes of miRNAs related to implantation failure (positive vs. negative  $\beta$ -hCG results) and miscarriage. Data from our previous transcriptomic study on endometrial receptivity were used to identify target genes of miRNAs related to the endometrial receptivity status (Haouzi, Mahmoud, et al., 2009). Hierarchical clustering analyses based on the different expression levels were performed with the CLUSTER and TREEVIEW software packages.

#### *TaqMan miRNA assays*

Complementary DNA was synthesized from total RNA of individual endometrial biopsies using the TaqMan miRNA-specific primers miR-3148, miR-4423-3p, miR-455-3p, miR-4445-3p, miR-3128, miR-181a-5p, miR-574-3p, miR-92a-3p, miR-320c, miR-342-3p, let-7d-5p, let-7b-5p, let-5c-5p, miR-15b-5p, miR-424-3p, miR-320b, miR-152-3p, and miR-155-5p (ref: #4427975, Life Technologies), according to the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit protocol (ref: 4366597, Applied Biosystems). For reverse transcription, 250 ng of each endometrial RNA sample or 5  $\mu\text{l}$  of each serum RNA sample, 0.15  $\mu\text{l}$  (100 mM) dNTPs, 1  $\mu\text{l}$  of 50 U/ $\mu\text{l}$  Multiscribe reverse transcriptase enzyme, 1.5  $\mu\text{l}$  of 10 $\times$  RT buffer, 0.19  $\mu\text{l}$  of 20 U/ $\mu\text{l}$  RNase inhibitor, and 3  $\mu\text{l}$  of 5 $\times$  RT primer (TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems) were used. Reaction mixtures (15  $\mu\text{l}$ ) were incubated first at  $16^{\circ}\text{C}$  for 30 min, and then at  $42^{\circ}\text{C}$  for 30 min, inactivated at



85°C for 5 min, and then stored at 4°C. Quantitative PCR was performed on a Roche LightCycler 480. The PCR reaction mixtures (final volume: 10 µl) included 3 µl of RT product, 5 µl 2 × TaqMan (No AmpErase UNG) Universal PCR Master Mix (ref: 4324018, Life Technologies) and 0.5 µl of primer from the 20 × TaqMan MicroRNA Assay working solution (ref: 4427975; Applied Biosystems). Reaction mixtures were incubated in a 384-well plate at 95°C for 10 min, followed by 50 cycles at 95°C for 15 s and at 60°C for 60 s. The miRNA expression levels in endometrial and serum samples were normalized to the expression level of the reference genes miR-16 and miR-638, respectively. The relative miRNA expression was calculated with the following formula:  $E_{\text{tested miRNA}}^{\Delta Ct} / E_{\text{housekeeping miRNA}}^{\Delta Ct}$  ( $E = 10^{-1/\text{slope}}$ ), where  $\Delta Ct = Ct \text{ control} - Ct \text{ unknown}$ , and E corresponds to the efficiency of the PCR reaction. The E value was obtained by a standard curve that varies in function of the used primers. A receptive endometrium sample was used as control. Each sample was analysed in duplicate and multiple water blanks were included.

### Statistical analyses

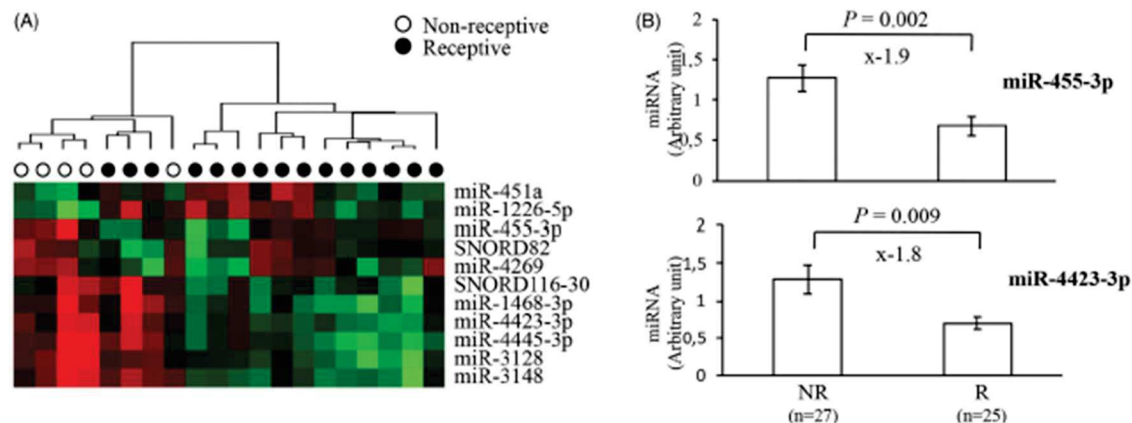
Except for the miRNomic and transcriptomic data, statistical analyses were performed with the GraphPad InStat 3 software. Data are expressed as the mean ± SEM or SD and differences between groups were considered significant when the Wilcoxon test gave a  $p < 0.05$ .

## Results

### Endometrial miRNome profile associated with the endometrial receptivity status

Microarray analysis according to the endometrial status (non-receptive vs. receptive) identified 11 small non-coding RNAs using the ANOVA test that were differentially expressed: miR-451a, miR-1226-5p were upregulated and SNORD82, SNORD116-30, miR-3148, miR-455-3p, miR-4423-3p, miR-4269, miR-1468-3p, miR-4445-3p, and miR-3128 were downregulated in receptive samples compared with non-receptive samples. Fold changes and FDR are shown in Supplementary Table 1. Supervised hierarchical clustering on the basis of the expression of these eleven small non-coding RNAs showed an adequate segregation between receptive and non-receptive samples (Figure 2(A)). Five candidates (miR-3148, miR-455-3p, miR-4423-3p, miR-3128 and miR-4445-3p) were selected for RT-qPCR validation. Two of them, miR-4423-3p and miR-455-3p were significantly downregulated in receptive endometrial samples ( $n = 25$ ) compared with non-receptive samples ( $n = 27$ ) from the validation cohort (Figure 2(B)). Conversely, miR-3128 and miR-3148 could not be quantified because the cycle threshold (Ct) values were above 40 cycles (Supplementary Table 1).

Ingenuity Pathway Analysis (IPA) of these 11 small non-coding RNAs to identify their target genes using our previous transcriptomic data (1012 genes associated with endometrium receptivity) (Haouzi, Mahmoud, et al., 2009) indicated that their targets were predominantly genes overexpressed during the implantation window



**Figure 2.** (A) Supervised hierarchical clustering using the eleven small non-coding RNAs associated with the endometrial receptivity status (receptive vs. non-receptive) during the implantation window. In grey, up- and downregulated miRNAs. (B) Validation of selected miRNAs in endometrial samples from the validation cohort by RT-qPCR. (C) Functional annotations of the 221 genes targeted by the small non-coding RNAs identified as differentially expressed according to the endometrial receptivity status using our previous transcriptomic dataset of human genes associated with endometrial receptivity. NR: non-receptive; R: receptive.



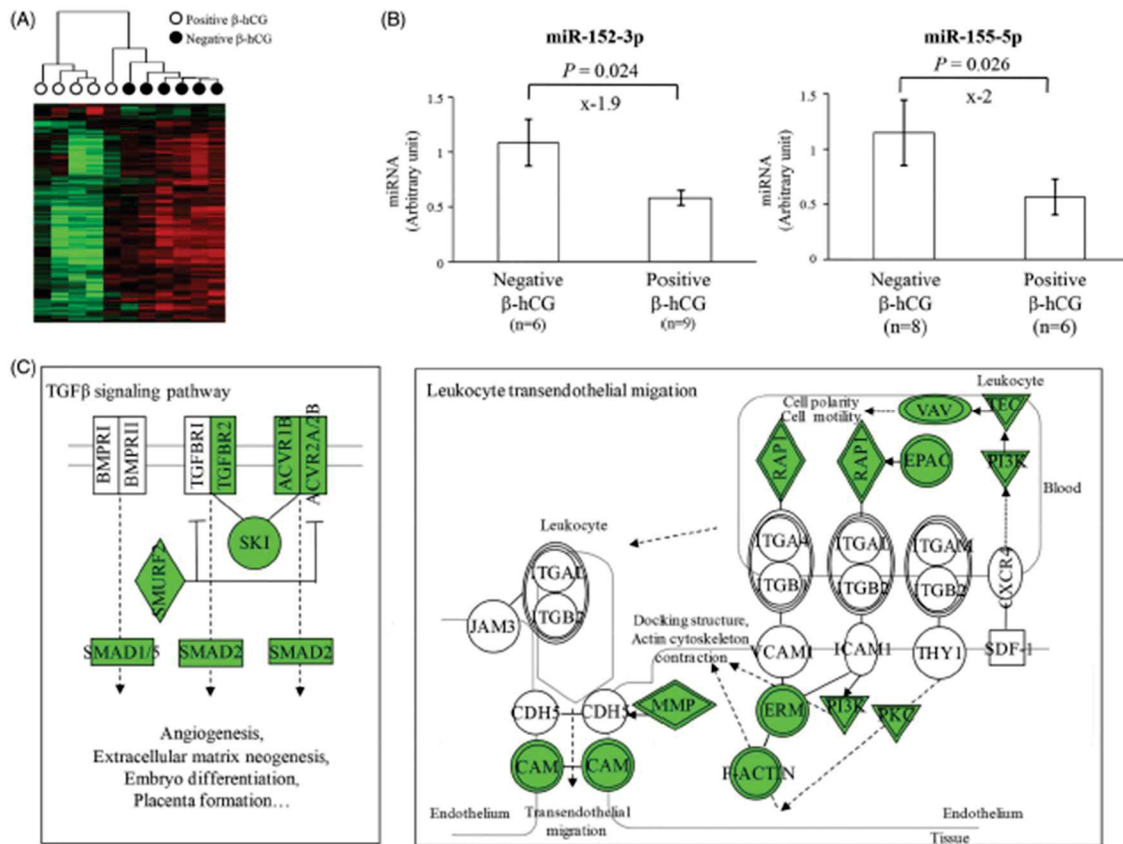
(c) Name p value range		Number of mRNAs	List of mRNAs
<b>Molecular and cellular functions</b>			
Cellular movement	1.40E-04 - 1.82E-12	80	ACVR1C, ACSL4, ADAM15S, ADAM15, ALHAZA, AG1H1, ALDH1A3, ALOX12, ANGPTL1, AQP3, ATOH8, ATP, AZGP1, BCAT1, CALCRL, CCL18, CD36, CDH1, CDH3, CLDN3, CLDN4, CLEC4E, CNR1, CXCL14, EDN1, EDNRB, EFEMP1, EGFL6, ELF3, ERBB3, EZR, F11R, FAM110C, FGD4, FGF1, FOXP1, FOXQ1, GATA6, GBP2, HAS2, ID4, IGF2, IGFBP3, KALRN, KLF4, KLF5, KLF6, LRRC15, MARCHF1, MET, MMP1, MUC1, MYH11, NEXN, NR2F1, NT5E, PCDH10, PGR, PLPP3, PRF1, PROK1, PTN, RNASE2, RORC, S100A4, SERPINF2, SFRP4, SLC8A1, SPOCK1, STK26, SULF1, TFPI, TGFA, TGFB2, TGM2, TIMP3, TMPRSS4, TP53INP2, TPD52L1, XCL1
Cellular development	1.56E-04 - 2.99E-09	94	ACSL4, ACVR1C, ADAM15S, ADAM15, AG1H1, AKR1B10, ALOX12, ANGPTL1, APCDD1, AQP3, ASIC2, ATOH8, ATP, AZGP1, CALCRL, CCL18, CD36, CDA, CDC42SE2, CDH1, CLDN4, CNR1, CXCL14, CYP2C9, CYP3A5, CYP24A1, DSC2, EDN1, EDNRB, EFEMP1, ELF3, EGFL6, ERBB3, ERO1A, EZR, F11R, FA2H, FGF1, FKBP5, FOXP1, FOXQ1, G0S2, GABRA2, GATA6, GCNT3, GLS, GNG4, GRIA1, HAS2, HNF1B, HOXB3, ID4, IGF2, IGFBP3, KALRN, KLF4, KLF5, KLF6, MAF, MAFF, MAFK, MET, MMP1, MUC1, MYL9, NR2F1, NRXN1, PDZD2, PGR, PROK1, PTGS1, PTN, PTHRN1, RORB, RORC, S100A4, SERPINF2, SFRP4, SIX2, SLC2A5, SLC8A1, SLC39A14, SNX10, STK26, SULF1, TFPI, TGFA, TGFB2, TGM2, TIMP3, TP53INP2, TPD52L1, TRIB3, VMP1
Cellular growth and proliferation	1.56E-04 - 6.97E-09	87	ACSL4, ACVR1C, ADAM15S, ADAM15, AG1H1, AKR1B10, ALOX12, ANGPTL1, APCDD1, ASIC2, ATOH8, ATP, CALCRL, CCL18, CD36, CD52, CDA, CDC42SE2, CDH1, CDH3, CLDN4, CLEC4E, CNR1, CXCL14, CYP2C9, CYP3A5, DSC2, EDN1, EDNRB, EGFL6, EFEMP1, ELF3, ERBB3, ERO1A, EZR, F11R, FGF1, FKBP5, FOXP1, FOXQ1, G0S2, GABRA2, GATA6, GBP2, GCNT3,
<b>Physiological system development and function</b>			
Organismal development	1.81E-04 - 8.83E-12	109	ABCC9, ACSL4, ACVR1C, ALHAZA, AG1H1, ALDH1A3, ALOX12, ANGPTL1, APCDD1, AQP3, ARSB, ASIC2, ATOH8, ATP, ATP1A2, AZGP1, CALCRL, CD36, CDH1, CDH3, CLEC4E, CNR1, COL4A4, CXCL14, CYBRD1, CYP2C9, CYP24A1, DHCR24, DHRS3, DSC2, DUOX2, EDN1, EDNRB, EFEMP1, EGFL6, ELF3, ERBB3, ERO1A, EZR, F11R, FA2H, FGF1, FOXP1, FOSQ1, FREM1, FREM2, G0S2, GABRA2, GABRE, GATA6, GBP2, GCNT3, GPX2, GRIA1, HAS2, HNF1B, HOXB3, ID4, IGF2, IGFBP3, KALRN, KLF4, KLF5, KLF6, KRT80, LRIG3, MAF, MAFF, MAFK, MET, MLIP, MMP1, MYH11, MYL9, NEXN, NPAS3, NR2F1, NT5E, PGR, PLPP3, PNP, PRF1, PROK1, PTGS1, PTN, RAB27B, RORB, RORC, S100A4, SERPINF2, SFRP4, SIX2, SLC2A5, SLC3A1, SLC30A2, SLC39A14, SLC5A1, SLC6A6, SLC8A1, SULF1, SYNPO, TFPI, TGFA, TGFB2, TGM2, TIMP3, TRNP1, TTC9, HLA-DQA1
Tissue development	1.81E-04 - 1.16E-09	83	AGTR1, ALDH1A3, ALOX12, ANGPTL1, APCDD1, AQP3, ARSB, ATOH8, ATP, CALCRL, CD36, CDH1, CDH3, CLDN3, COL4A4, CNR1, CXCL14, CYP2C9, CYP24A1, DHCR24, DSC2, DUOX2, EDN1, EDNRB, EFEMP1, ELF3, EGFL6, ERBB3, ERO1A, EZR, FA2H, F11R, FGF1, FOXP1, FOXQ1, FREM1, FREM2, GATA6, GCNT3, HAS2, HNF1B, HOXB3, ID4, IGF2, IGFBP3, KALRN, KLF4, KLF5, KLF6, KRT80, LRIG3, MAF, MAFF, MAFK, MET, MMP1, NR2F1, NRXN1, PGR, PROK1, PTGS1, PTN, RORB, RORC, S100A4, SCIN, SERPINF2, SFRP4, SIX2, SLC2A5, SLC30A2, SLC39A14, SLC5A1, SLC8A1, SNX10, SULF1, TFPI, TGFA, TGFB2, TGM2, TIMP3, TP53INP2, TRIB3
Embryonic development	1.81E-04 - 1.66E-08	72	ADEA2A, AGTR1, ALDH1A3, APCDD1, AQP3, ARSB, ATP, CALCRL, CD36, CDH1, CDH3, CNR1, COL4A4, CXCL14, DHCR24, DHRS3, DSC2, DUOX2, EDN1, EDNRB, ELF3, EFEMP1, ERBB3, EZR, FA2H, FGF1, FOXP1, FOXQ1, FREM1, FREM2, GABRA2, GABRE, GATA6, GCNT3, HAS2, HNF1B, HOXB3, ID4, IGF2, KALRN, KLF4, KLF5, KLF6, KRT80, LRIG3, MAF, MAFF, MAFK, MET, MYH11, NPAS3, NR2F1, PGR, PLPP3, PTN, PTGS1, RORB, RORC

Figure 2. Continued.

(945 upregulated and 67 downregulated genes). Nine miRNAs of the 11 small non-coding RNAs targeted 221 mRNAs related to the endometrial receptivity signature (209 upregulated and 12 downregulated genes) that includes genes involved in cellular movement, cellular development and cellular growth proliferation, and also organismal development, tissue development, and embryonic development (i.e. the three top molecular/cellular functions and physiological system development/system functions, respectively) (Figure 2(C)). In addition, the miR-3128 targeted a gene (*PROK1*) of our endometrial receptivity biomarkers referred in the Win-Test.

### Endometrial miRNome profile associated with implantation failure

Microarray analysis according to FET outcome (positive and negative  $\beta$ -hCG results) identified 261 small non-coding RNAs as differentially expressed. Sixteen and 245 small non-coding RNAs were down- and upregulated, respectively in endometrial samples associated with implantation failure. Supervised hierarchical clustering of these 261 small non-coding RNAs showed a good segregation of receptive endometrium samples from patients with positive ( $n = 5$ ) and negative ( $n = 6$ )  $\beta$ -hCG results (Figure 3(A)). Seven miRNAs were



**Figure 3.** (A) Supervised hierarchical clustering using the 261 small non-coding RNAs associated with implantation failure in patients with receptive endometrium samples and with positive and negative  $\beta$ -hCG results after customized frozen embryo transfer. In grey, up- and downregulated miRNAs. (B) Validation of selected miRNAs in endometrial samples from the validation cohort by RT-qPCR. (C) Functional annotations of the miR-155-5p revealed that the TGF $\beta$  signalling and leukocyte extravasation signalling were among the top canonical pathways associated with implantation failure miRNAs. In grey, up- and downregulated miRNAs.

selected for RT-qPCR experiments in the validation cohort: let-7b-5p, let-7c-5p, miR-15b-5p, miR-424-3p, miR-320b, miR-152-3p and miR-155-5p (Supplementary Table 1). However, only miR-152-3p and miR-155-5p were significantly differentially expressed in endometrium samples from patients with positive and negative  $\beta$ -hCG results (Figure 3(B)). The others were not validated in the validation cohort (17 and 17 positive and negative  $\beta$ -hCG, respectively, corresponding to 34 individual patients) (Supplementary Table 1). We then performed IPA to identify the predicted target genes of the two miRNAs validated by RT-qPCR. IPA indicated that miR-155-5p was predicted to target 552 genes that are involved in many molecular and cellular functions, including gene expression ( $p$  value range:  $1.29E-08$  to  $3.01E-32$ , 200 genes), cell death and survival ( $p$  value range:  $1.06E-06$  to  $3.78E-18$ , 224 genes), cellular development ( $p$  value range:  $1.92E-06$  to  $2.03E-15$ , 237 genes), cellular growth and proliferation ( $p$  value range:  $2.32E-06$  to

$2.03E-15$ , 230 genes) and cell cycle ( $p$  value range:  $2.43E-06$  to  $2.27E-15$ , 133 genes). In addition, TGF $\beta$  signalling ( $p = 8.27E-09$ ) and leukocyte extravasation signalling were among the top canonical pathways (Figure 3(C)). MiR-152-3p was predicted to target 69 genes involved in cellular assembly and organization ( $p$  value range:  $1.11E-02$  to  $5.24E-06$ , 27 genes), cellular function and maintenance ( $p$  value range:  $1.05E-02$  to  $5.24E-06$ , 22 genes), cell-to-cell signalling and interaction ( $p$  value range:  $1.15E-02$  to  $1.44E-05$ , 19 genes), cell morphology ( $p$  value range:  $1.11E-02$  to  $1.61E-05$ ) and cellular development ( $p$  value range:  $1.15E-02$  to  $7.10E-05$ , 33 genes).

#### Endometrial miRNome profile associated with miscarriage

Microarray analysis according to the clinical outcome (i.e. live birth or miscarriage between 8 and 12 weeks



of amenorrhoea) identified 76 small non-coding RNAs that were differentially expressed in these two groups according to the ANOVA test. Sixty-seven and nine small non-coding RNAs were down- and up-regulated, respectively, in endometrium samples from patients with miscarriage compared with patients with a live birth. Supervised hierarchical clustering on the basis of the expression of these 76 small non-coding RNAs showed a good segregation between endometrium samples from patients with miscarriage and live birth (Figure 4). Five miRNAs were selected for RT-qPCR validation in endometrium from patients with a miscarriage ( $n=14$ ) and a live birth ( $n=21$ ): miR-181a-5p, miR-574-3p, miR-92a-3p, miR-320c and let-7d-5p. None of these miRNAs were significantly validated by RT-qPCR (Supplementary Table 1).

#### Circulating miRNA quantification as potential biomarkers of endometrial receptivity and implantation failure: preliminary results

First, RT-qPCR analysis of miR-4423-3p and miR-455-3p, the two validated miRNAs related to the endometrial receptivity status, indicated that they could not be quantified in serum RNA samples from the validation cohort (12 receptive and 12 non-receptive samples) because the cycle threshold (Ct) was above 40 cycles (data not shown). Then, comparison of the serum expression of let-7b-5p, let-7c-5p, miR-15b-5p, miR-424-3p and miR-320b showed that their expression level (mean  $\pm$  SEM) was higher, but not significantly, in samples from patients with negative  $\beta$ -hCG results

( $n=6$ ) compared with patients with positive  $\beta$ -hCG ( $n=4$ ):  $1.48 \pm 0.56$  vs.  $0.64 \pm 0.16$  ( $x=2.3$ ,  $p=0.22$ ) for let-7b-5p,  $1.56 \pm 0.74$  vs.  $0.79 \pm 0.13$  ( $x=1.97$ ,  $p=0.36$ ) for let-7c-5p,  $1.48 \pm 0.67$  vs.  $0.63 \pm 0.28$  ( $x=2.36$ ,  $p=0.28$ ) for miR-15b-5p,  $1.82 \pm 1.02$  vs.  $0.82 \pm 0.28$  ( $x=2.2$ ,  $p=0.39$ ) for miR-424-3p, and  $1.31 \pm 0.97$  vs.  $0.97 \pm 0.38$  ( $x=1.34$ ,  $p=0.63$ ) for miR-320b (Supplementary Figure S2).

#### Discussion

By performing miRNA profiling in endometrial samples according to the endometrial receptivity status and the ART outcomes, we identified miRNAs associated with endometrial receptivity and implantation failure. While several recent studies have analysed the miRNome of endometrium samples at different cycle phases (Altmäe et al., 2013; Kresowik et al., 2014; Kuokkanen et al., 2010; Rekker et al., 2018; Sha et al., 2011), the present study was the first to assess the endometrial miRNome according to the endometrial receptivity status by comparing endometrium obtained during the implantation window and identified as receptive and non-receptive with the Win-Test. Comparison of our data with those of previous studies (Altmäe et al., 2013; Kresowik et al., 2014; Kuokkanen et al., 2010; Sha et al., 2011) indicated that only miR-455-3p was previously identified as differentially expressed. Discrepancies might be due to differences in technical and statistical approaches (Altmäe et al., 2014; Haouzi et al., 2012; Irizarry et al., 2005). Moreover, in the present study, we analysed the miRNome according to the endometrial receptivity status during the implantation window and not according to the cycle phase as others. Nevertheless, Sha et al. (2011) found that miR-455-3p is downregulated during the mid-secretory phase compared with the early secretory phase and in receptive endometrium during the implantation window compared with non-receptive endometrium. Similarly, Vilella et al. (2015) reported that miR-455-3p is downregulated in endometrial fluid during the mid-secretory phase compared with the early-secretory phase. The role of miR-455-3p in the regulation of endometrial receptivity acquisition remains to be elucidated. However, several recent studies reported that miR-455-3p could function as a tumour suppressor by regulating cancer cell proliferation, migration and invasion (Gao et al., 2018; H. Yang et al., 2017; Zhang et al., 2018). By affecting these biological functions, miR-455-3p might regulate the acquisition of the endometrial receptivity phenotype. This is consistent with our previous study

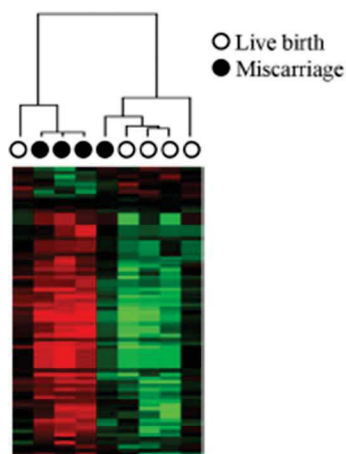


Figure 4. Supervised hierarchical clustering using the 76 small non-coding RNAs associated with miscarriages in patients with receptive endometrium samples and live birth or miscarriage after customized frozen embryo transfer. In grey, up- and downregulated miRNAs.



showing that migration inhibition in primary human endometrial epithelial and stromal cells affects the acquisition of the endometrial receptivity status (Bissonnette et al., 2016). In agreement, the miRNAs associated with the receptivity status target 221 mRNAs from our previous endometrial receptivity transcriptomic signature that are predominantly overexpressed during the implantation window (209 upregulated and 12 downregulated) and are involved in cellular movement, cellular development and cellular growth proliferation.

On the other hand, previous studies compared the endometrium miRNome according to the ART outcome (Choi et al., 2016; Rekker et al., 2018; Revel et al., 2011; C. Shi et al., 2017; Xu et al., 2019) using endometrium obtained during the implantation window (Table 1) from fertile (Choi et al., 2016; Rekker et al., 2018; Revel et al., 2011) or infertile women (C. Shi et al., 2017; Xu et al., 2019) and RIF patients respectively. It is important to note, that the definition of RIF was different among studies. Indeed, RIF was defined as failure to conceive in at least three previous IVF cycles with good quality embryos by Choi et al. (2016), as at least four ART cycles with embryo transfer failure by Revel et al. (2011), as three embryo transfer failures in which at least four morphologically high-grade embryos were transferred by C. Shi et al. (2017), three unsuccessful IVF cycles with embryo transfer by Rekker et al. (2018), and three transplantation failure with at least four good-quality embryos by Xu et al. (2019). Although there is no consensus about RIF definition, it is difficult to understand what 'failure to conceive' or 'transfer failure' really defines: negative  $\beta$ -hCG, absence of clinical pregnancy (i.e. visualization of a gestational sac with a positive foetal heartbeat), or absence of at least one live birth? Nevertheless, all these studies reported different miRNA expression profiles in patients with RIF and in fertile or infertile women, although we could not find any miRNA common to all four studies. Here, we compared the miRNome profiles according to the  $\beta$ -hCG results (negative versus positive) and could identify 261 small non-coding RNAs that were mainly overexpressed (94%) in RIF patients with negative  $\beta$ -hCG results. Among these 261 small non-coding RNAs, eleven miRNAs (miR-3609, miR-3175, miR-146a-5p, miR-342-3p, miR-744-5p, miR-424-3p, miR-182-5p, miR-423-3p, miR-196b-5p, miR-125b-5p, and miR-146b-5p) have been previously reported over-expressed during the implantation window in RIF compared with fertile or infertile patients (Choi et al., 2016; Revel et al., 2011; C. Shi et al., 2017). In the present study, we reported

for the first time the overexpression of miR-152-3p and miR-155-5p in receptive endometrium associated with implantation failure, that was validated by RT-qPCR in an independent cohort of RIF patients. The role of miR-152-3p and miR-155-5p in the implantation process is unknown. However, in numerous cancers, several studies have shown that miR-152-3p suppressed cell proliferation, migration, invasion, angiogenesis and extracellular matrix remodelling, the biological functions necessary for a successful implantation (Bryant et al., 2020; X. Li et al., 2020; Luan et al., 2017; Wang et al., 2019). Similarly, several *in vivo* and *in vitro* studies reported that miR-155-5p overexpression suppressed cell proliferation, migration, and invasion and induced apoptosis in multiple cancers (L. Chen et al., 2019; Lin et al., 2018; Luo et al., 2020; Thomsen et al., 2015). More precisely, miR-155-5p inhibited the expression of a number of genes related to the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) including *smad2/3* (Lin et al., 2018; Q. Shi et al., 2020; Xiang et al., 2011). As successful embryo implantation is associated with EMT, deregulation of miR-155-5p might explain implantation failure. This is consistent with our *in silico* functional annotations of the miR-155-5p-target genes revealing an alteration of the leukocyte extravasation signalling, a signalling pathway mimicking the implantation process, and the TGF $\beta$  signalling. As TGF $\beta$  is a key factor in the induction of EMT, deregulation of the TGF $\beta$  signalling may affect this process, and consequently successful implantation. These findings can be considered in conjunction with our previous transcriptomic study reporting the overexpression of numerous genes related to these two signalling pathways during the implantation window (Haouzi, Assou, et al., 2009). Interestingly, D. Li and J. Li (2016) identified six miRNAs as differentially expressed in decidual natural killer cells purified from decidua samples of patients with unexplained recurrent spontaneous abortion compared with patients without history of spontaneous abortion. Four miRNAs overexpressed in decidual natural killer cells from patients with recurrent spontaneous abortion (miR-34a-5p, miR-155-5p, miR-125a-3p/5p, and miR-125b-5p) were also overexpressed in the receptive endometrium from our patients with implantation failure (negative  $\beta$ -hCG results).

Finally, we identified 76 small non-coding RNAs that are differentially expressed in receptive endometrium from patients with early miscarriage compared with patients who delivered after FET. However, to date, we were unable to validate any of the five selected miRNAs.



Several limiting issues of our present study must be addressed. First, the number of samples used for microarray analyses were relatively small and further reduced per outcome (implantation failure, miscarriage). Moreover, microarray screening was performed in the RIF population. Therefore, we cannot exclude that miRNA signatures identified in the present study are inherent to RIF compared with a fertile group. On the other hand, endometrial receptivity was defined using our biomarkers referred in the Win-Test. As no universal endometrial receptivity transcriptomic signature was defined to date, the miRNome profile identified in the present study could be different using other endometrial receptivity biomarkers. In addition, according to the molecular diagnostic tools available, few of our biomarkers are in common with others (Díaz-Gimeno et al., 2011; Enciso et al., 2018). The strength and the robustness of our study which allowed the identification of endometrial receptivity biomarkers compared with others were in part reviewed in Haouzi et al. (2012). Moreover, the clinical benefit of recommendations advised according to certain diagnostic tools for endometrial receptivity assessment was recently discussed in Lessey and Young (2019). Second, few candidates identified by microarrays as differentially expressed in endometrial tissues according to the endometrial receptivity status and ART outcome have been validated. Although miRNA microarrays are usually used to discover tools as they are inexpensive but have the lowest sensitivity, the validation of results requires an alternative method such as RT-qPCR. However, studies reported a low correlation between results obtained with microarrays and qPCR-array or single Taqman assays due to a higher false positive rate of differential miRNA expression using the microarray compared with others (Binderup et al., 2018; Y. Chen et al., 2009). The miRNA gene probe design on the Affymetrix platform, such as the GC content and melting temperature, can explain the high false positive rate and differences with Taqman technology (Pradervand et al., 2010).

The present study reports an endometrial miRNome signature during the implantation window that is associated with the endometrial receptivity status and ART success after customized FET. Four miRNAs are promising candidates for potential clinical applications to predict implantation failure and consequently, to increase ART success.

### Acknowledgements

This work was performed with the institutional support by the French INSERM and the University Hospital of

Montpellier public institutions. The authors thank Dr Aït-ahmed Ounissa for comments and discussions.

### Disclosure statement

The authors of the study have no competing interests to report.

### Funding

This study was partially supported by a grant from Gedeon Richter company [Grant Forward2018\_4].

### ORCID

Loubna Drissennek  <http://orcid.org/0000-0003-3643-1956>  
 Chloé Baron  <http://orcid.org/0000-0002-5490-6743>  
 Sophie Brouillet  <http://orcid.org/0000-0003-3354-1551>  
 Frida Entezami  <http://orcid.org/0000-0001-7891-1048>  
 Samir Hamamah  <http://orcid.org/0000-0001-7357-285X>  
 Delphine Haouzi  <http://orcid.org/0000-0002-4740-8404>

### References

- Altmäe, S., Esteban, F. J., Stavreus-Evers, A., Simón, C., Giudice, L., Lessey, B. A., Horcajadas, J. A., Macklon, N. S., D'Hooghe, T., Campoy, C., Fauser, B. C., Salamonsen, L. A., & Salumets, A. (2014). Guidelines for the design, analysis and interpretation of 'omics' data: Focus on human endometrium. *Human Reproduction Update*, 20(1), 12–28. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt048>
- Altmäe, S., Martínez-Conejero, J. A., Esteban, F. J., Ruiz-Alonso, M., Stavreus-Evers, A., Horcajadas, J. A., & Salumets, A. (2013). MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 20(3), 308–317. <https://doi.org/10.1177/1933719112453507>
- Backes, C., Meese, E., & Keller, A. (2016). Specific miRNA disease biomarkers in blood, serum and plasma: challenges and prospects. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 20(6), 509–518. <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0221-4>
- Bassil, R., Casper, R., Samara, N., Hsieh, T. B., Barzilay, E., Orvieto, R., & Haas, J. (2018). Does the endometrial receptivity array really provide personalized embryo transfer? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(7), 1301–1305. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1190-9>
- Binderup, H. G., Madsen, J. S., Heegaard, N. H. H., Houliand, K., Andersen, R. F., & Brasen, C. L. (2018). Quantification of microRNA levels in plasma – Impact of preanalytical and analytical conditions. *PLoS One*, 13(7), e0201069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201069>
- Bissonnette, L., Drissennek, L., Antoine, Y., Tiers, L., Hirtz, C., Lehmann, S., Perrochia, H., Bissonnette, F., Kadoch, I.-J., Haouzi, D., & Hamamah, S. (2016). Human S100A10 plays a crucial role in the acquisition of the endometrial receptivity phenotype. *Cell Adhesion & Migration*, 10(3), 282–298. <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1128623>
- Boren, T., Xiong, Y., Hakam, A., Wenham, R., Apte, S., Wei, Z., Kamath, S., Chen, D. T., Dressman, H., & Lancaster, J. M.



- (2008). MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with endometrial carcinogenesis. *Gynecologic Oncology*, 110(2), 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.03.023>
- Bryant, J., White, L., Coen, N., Shields, L., McClean, B., Meade, A. D., Lyng, F. M., & Howe, O. (2020). MicroRNA analysis of atm-deficient cells indicate PTEN and CCDN1 as potential biomarkers of radiation response. *Radiation Research*, 193(6), 520. <https://doi.org/10.1667/RR15462.1>
- Bueno, M. J., & Malumbres, M. (2011). MicroRNAs and the cell cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(5), 592–601. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2011.02.002>
- Chen, L., Zheng, S. Y., Yang, C. Q., Ma, B. M., & Jiang, D. (2019). MiR-155-5p inhibits the proliferation and migration of VSMCs and HUVECs in atherosclerosis by targeting AKT1. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(5), 2223–2233. [https://doi.org/10.26355/eur-rev\\_201903\\_17270](https://doi.org/10.26355/eur-rev_201903_17270)
- Chen, Y., Gelfond, J. A., McManus, L. M., & Shireman, P. K. (2009). Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics*, 10, 407. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-407>
- Choi, Y., Kim, H. R., Lim, E. J., Park, M., Yoon, J. A., Kim, Y. S., Kim, E.-Y., Shin, J.-E., Kim, J. H., Kwon, H., Song, H., & Choi, D. H. (2016). Integrative analyses of uterine transcriptome and MicroRNAome reveal compromised LIF-STAT3 signaling and progesterone response in the endometrium of patients with recurrent/repeated implantation failure (RIF). *PLoS One*, 11(6), e0157696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157696>
- Creighton, C. J., Benham, A. L., Zhu, H., Khan, M. F., Reid, J. G., Nagaraja, A. K., Fountain, M. D., Dziadek, O., Han, D., Ma, L., Kim, J., Hawkins, S. M., Anderson, M. L., Matzuk, M. M., & Gunaratne, P. H. (2010). Discovery of novel microRNAs in female reproductive tract using next generation sequencing. *PLoS One*, 5(3), e9637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009637>
- Díaz-Gimeno, P., Horcajadas, J. A., Martínez-Conejero, J. A., Esteban, F. J., Alama, P., Pellicer, A., & Simón, C. (2011). A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertility and Sterility*, 95(1), 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.04.063>
- Enciso, M., Carrascosa, J. P., Sarasa, J., Martínez-Ortiz, P. A., Munné, S., Horcajadas, J. A., & Aizpurua, J. (2018). Development of a new comprehensive and reliable endometrial receptivity map (ER Map/ER Grade) based on RT-qPCR gene expression analysis. *Human Reproduction*, 33(2), 220–228. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex370>
- Gao, X., Zhao, H., Diao, C., Wang, X., Xie, Y., Liu, Y., Han, J., & Zhang, M. (2018). miR-455-3p serves as prognostic factor and regulates the proliferation and migration of non-small cell lung cancer through targeting HOXB5. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 1074–1080. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.123>
- Garzon, R., Marcucci, G., & Croce, C. M. (2010). Targeting microRNAs in cancer: Rationale, strategies and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(10), 775–789. <https://doi.org/10.1038/nrd3179>
- Hamamah, S., Haouzi, D. (2011). *Methods for assessing endometrium receptivity of a patient* (Patent application number PCT/EP2011/058757). <https://patents.google.com/patent/US9260748B2/>
- Haouzi, D., Assou, A., Mahmoud, K., Tondeur, S., Rème, T., Hedon, B., De Vos, J., & Hamamah, S. (2009). Gene expression profile of human endometrial receptivity: Comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 24(6), 1436–1445. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep039>
- Haouzi, D., Assou, S., Dechanet, C., Anahory, T., Dechaud, H., De Vos, J., & Hamamah, S. (2010). Controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization alters endometrial receptivity in humans: Protocol effects. *Biology of Reproduction*, 82(4), 679–686. <https://doi.org/10.1095/biol-reprod.109.081299>
- Haouzi, D., Bissonnette, L., Gala, A., Assou, S., Entezami, F., Perrochia, H., Dechaud, H., Hugues, J.-N., & Hamamah, S. (2014). Endometrial receptivity profile in patients with premature progesterone elevation on the day of HCG administration. *BioMed Research International*, 2014, 951937. <https://doi.org/10.1155/2014/951937>
- Haouzi, D., Dechaud, H., Assou, S., De Vos, J., & Hamamah, S. (2012). Insights into human endometrial receptivity from transcriptomic and proteomic data. *Reproductive BioMedicine Online*, 24(1), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.09.009>
- Haouzi, D., Dechaud, H., Assou, S., Morzo, C., de Vos, J., & Hamamah, S. (2011). Transcriptome analysis reveals dialogues between human trophoblast and endometrial cells during the implantation period. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 26(6), 1440–1449. <https://doi.org/10.1093/humrep/der075>
- Haouzi, D., Mahmoud, K., Fourar, M., Bendhaou, K., Dechaud, H., De Vos, J., Rème, T., Dewailly, D., & Hamamah, S. (2009). Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 24(1), 198–205. <https://doi.org/10.1093/humrep/den360>
- Irizarry, R. A., Warren, D., Spencer, F., Kim, I. F., Biswal, S., Frank, B. C., Gabrielson, E., Garcia, J. G. N., Geoghegan, J., Germino, G., Griffin, C., Hilmer, S. C., Hoffman, E., Jedlicka, A. E., Kawasaki, E., Martínez-Murillo, F., Morsberger, L., Lee, H., Petersen, D., ... Yu, W. (2005). Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. *Nature Methods*, 2(5), 345–350. <https://doi.org/10.1038/nmeth756>
- Kresowik, J. D., Devor, E. J., Van Voorhis, B. J., & Leslie, K. K. (2014). MicroRNA-31 is significantly elevated in both human endometrium and serum during the window of implantation: A potential biomarker for optimum receptivity. *Biology of Reproduction*, 91(1), 17. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116590>
- Kuokkanen, S., Chen, B., Ojalvo, L., Benard, L., Santoro, N., & Pollard, J. W. (2010). Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biology of Reproduction*, 82(4), 791–801. <https://doi.org/10.1095/biol-reprod.109.081059>
- Lessey, B. A., & Young, S. T. (2019). What exactly is endometrial receptivity? *Fertility and Sterility*, 111(4), 611–617. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.02.009>
- Li, D., & Li, J. (2016). Association of miR-34a-3p/5p, miR-141-3p/5p, and miR-24 in decidual natural killer cells with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Medical*



- Science Monitor*, 22, 922–929. <https://doi.org/10.12659/MSM.895459>
- Li, X., Zou, W., Wang, Y., Liao, Z., Li, L., Zhai, Y., Zhang, L., Gu, S., & Zhao, X. (2020). Plasma-based microRNA signatures in early diagnosis of breast cancer. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 8(5), e1092. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1092>
- Lin, J., Chen, Y., Liu, L., Shen, A., & Zheng, W. (2018). MicroRNA-155-5p suppresses the migration and invasion of lung adenocarcinoma A549 cells by targeting *Smad2*. *Oncology Letters*, 16(2), 2444–2452. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8889>
- Luan, W. K., Li, R., Liu, L., Ni, X., Shi, Y., Xia, Y., Wang, J., Lu, F., & Xu, B. (2017). Long non-coding RNA HOTAIR acts as a competing endogenous RNA to promote malignant melanoma progression by sponging miR-152-3p. *Oncotarget*, 8(49), 85401–85414. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19910>
- Luo, X., Dong, J., He, X., Shen, L., Long, C., Liu, F., Liu, X., Lin, T., He, D., & Wei, G. (2020). MiR-155-5p exerts tumor-suppressing functions in Wilms tumor by targeting IGF2 via the PI3K signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 125, 109880. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109880>
- Ohlsson Teague, E. M., Van der Hoek, K. H., Van der Hoek, M. B., Perry, N., Wagaarachchi, P., Robertson, S. A., Print, C. G., & Hull, L. M. (2009). MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Molecular Endocrinology*, 23(2), 265–275. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0387>
- Pradervand, S., Weber, J., Lemoine, F., Consales, F., Paillusson, A., Dupasquier, M., Thomas, J., Richter, H., Kaessmann, H., Beaudoin, E., Hagenbüchle, O., & Harshman, K. (2010). Concordance among digital gene expression, microarrays, and qPCR when measuring differential expression of microRNAs. *BioTechniques*, 48(3), 219–222. <https://doi.org/10.2144/000113367>
- Qin, W., Tang, Y., Yang, N., Wei, X., & Wu, J. (2016). Potential role of circulating microRNAs as a biomarker for unexplained recurrent spontaneous abortion. *Fertility and Sterility*, 105(5), 1247–1254.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.01.028>
- Rekker, K., Altmäe, S., Suhorutshenko, M., Peters, M., Martínez-Blanch, J. F., Codoñer, F. M., Vilella, F., Simón, C., Salumets, A., & Velthut-Meikas, A. (2018). A two-cohort RNA-seq study reveals changes in endometrial and blood miRNome in fertile and infertile women. *Genes*, 9(12), 574. <https://doi.org/10.3390/genes9120574>
- Revel, A., Achache, H., Stevens, J., Smith, Y., & Reich, R. (2011). MicroRNAs are associated with human embryo implantation defects. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 26(10), 2830–2840. <https://doi.org/10.1093/humrep/der255>
- Ruiz-Alonso, M., Blesa, D., Díaz-Gimeno, P., Gómez, E., Fernández-Sánchez, M., Carranza, F., Carrera, J., Vilella, F., Pellicer, A., & Simón, C. (2013). The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertility and Sterility*, 100(3), 818–824. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.05.004>
- Sha, A. G., Liu, J. L., Jiang, X. M., Ren, J. Z., Ma, C. H., Lei, W., Su, R.-W., & Yang, Z. M. (2011). Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing. *Fertility and Sterility*, 96(1), 150–155.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.072>
- Shi, C., Shen, H., Fan, L. J., Guan, J., Zheng, X. B., Chen, X., Liang, R., Zhang, X., Cui, Q., Sun, K.-K., Zhao, Z.-R., & Han, H. J. (2017). Endometrial MicroRNA Signature during the Window of Implantation Changed in Patients with Repeated Implantation Failure. *Chinese Medical Journal*, 130(5), 566–573. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.200550>
- Shi, Q., Zhang, Y., Liu, W., Xiao, H., Qi, Y., Li, J., & Luo, B. (2020). Latent membrane protein 2A inhibits expression level of *Smad2* through regulating miR-155-5p in EBV-associated gastric cancer cell lines. *Journal of Medical Virology*, 92(1), 96–106. <https://doi.org/10.1002/jmv.25579>
- Thomsen, K. G., Terp, M. G., Lund, R. R., Søkilde, R., Elias, D., Bak, M., Litman, T., Beck, H. C., Lyng, M. B., & Ditzel, H. J. (2015). miR-155, identified as anti-metastatic by global miRNA profiling of a metastasis model, inhibits cancer cell extravasation and colonization in vivo and causes significant signaling alterations. *Oncotarget*, 6(30), 29224–29539. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4942>
- Vilella, F., Moreno-Moya, J. M., Balaguer, N., Grasso, A., Herrero, M., Martínez, S., Marcilla, A., & Simón, C. (2015). Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development (Cambridge, England)*, 142(18), 3210–3221. <https://doi.org/10.1242/dev.124289>
- Wang, R., Bai, Z., Wen, X., Du, H., Zhou, L., Tang, Z., Yang, Z., & Ma, W. (2019). MiR-152-3p regulates cell proliferation, invasion and extracellular matrix expression through by targeting FOXF1 in keloid fibroblasts. *Life Sciences*, 234, 116779. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116779>
- Xiang, X., Zhuang, X., Ju, S., Zhang, S., Jiang, H., Mu, J., Zhang, L., Miller, D., Grizzle, W., & Zhang, H. G. (2011). miR-155 promotes macroscopic tumor formation yet inhibits tumor dissemination from mammary fat pads to the lung by preventing EMT. *Oncogene*, 30(31), 3440–3453. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.54>
- Xu, H., Zhou, M., Cao, Y., Zhang, D., Han, M., Gao, X., Xu, B., & Zhang, A. (2019). Genome-wide analysis of long non-coding RNAs, microRNAs, and mRNAs forming a competing endogenous RNA network in repeated implantation failure. *Gene*, 720, 144056. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144056>
- Yang, H., Wei, Y. N., Zhou, J., Hao, T. T., & Liu, X. L. (2017). MiR-455-3p acts as a prognostic marker and inhibits the proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by targeting FAM83F. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21(14), 3200–3206. <https://www.europeanreview.org/article/13141>
- Yang, L., & Liu, H. Y. (2014). Small RNA molecules in endometriosis: Pathogenesis and therapeutic aspects. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 183, 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.10.043>
- Yao, N., Lu, C. L., Zhao, J. J., Xia, H. F., Sun, D. G., Shi, X. Q., Wang, C., Li, D., Cui, Y., & Ma, X. (2009). A network of miRNAs expressed in the ovary are regulated by FSH. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14, 3239–3245. <https://doi.org/10.2741/3447>

- Zhang, S., Wu, W., Jiao, G., Li, C., & Liu, H. (2018). MiR-455-3p activates Nrf2/ARE signaling via HDAC2 and protects osteoblasts from oxidative stress. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107(Pt B), 2094–2101. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2017.10.080>
- Zhao, J. J., Hua, Y. J., Sun, D. G., Meng, X. X., Xiao, H. S., & Ma, X. (2006). Genome-wide microRNA profiling in human fetal nervous tissues by oligonucleotide microarray. *Child's Nervous System : ChNS : Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 22(11), 1419–1425. <https://doi.org/10.1007/s00381-006-0173-9>
- Zhao, J. J., Yang, J., Lin, J., Yao, N., Zhu, Y., Zheng, J., Xu, J., Cheng, J. Q., Lin, J.-Y., & Ma, X. (2009). Identification of miRNAs associated with tumorigenesis of retinoblastoma by miRNA microarray analysis. *Child's Nervous System : ChNS: Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 25(1), 13–20. <https://doi.org/10.1007/s00381-008-0701-x>

### **Supplementary Figure S1: The Win-Test**

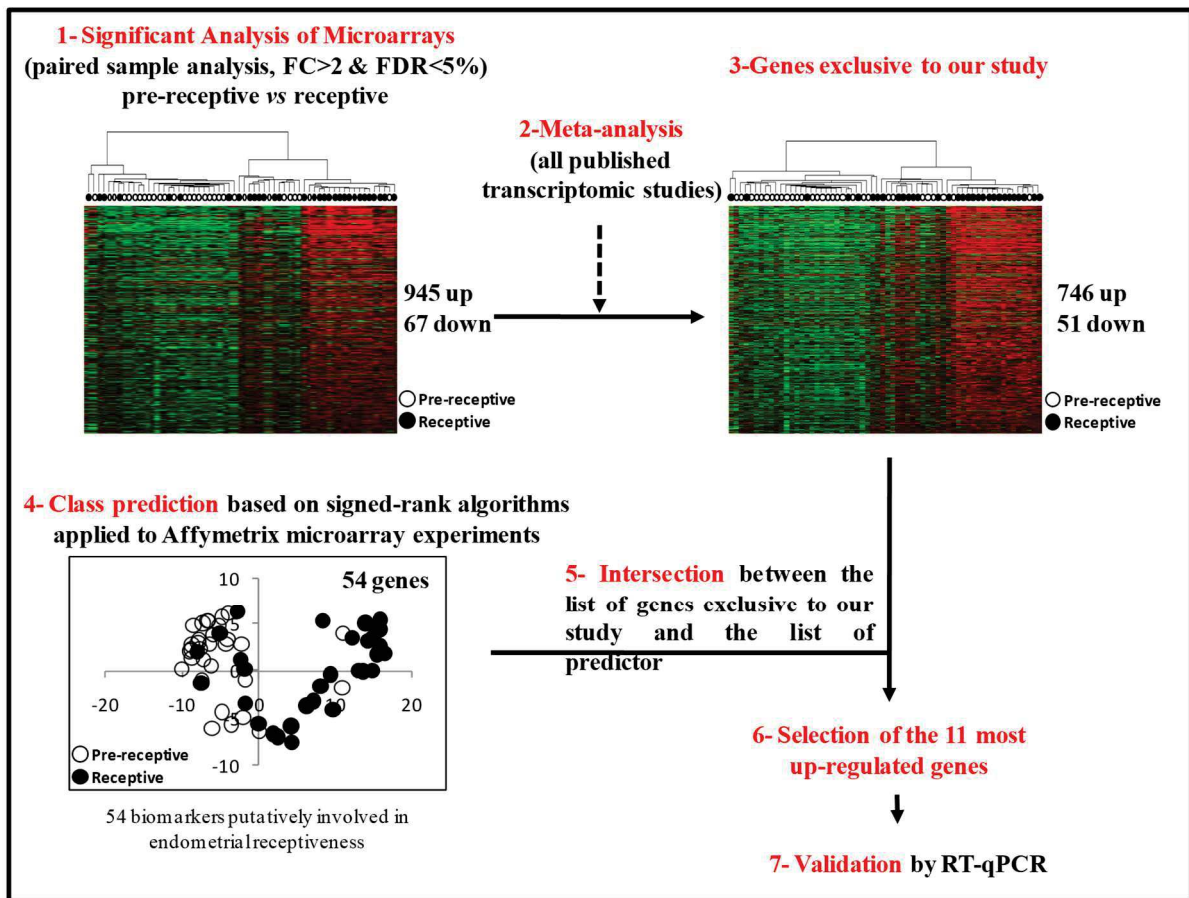
*Workflow for the Win-Test gene selection:* The 11 genes involved in human endometrial receptivity included in the Win-Test were selected by comparing the gene expression profiles of receptive (LH+7, n=31) and pre-receptive (LH+2, n=31) endometrium obtained in our previous transcriptomic analysis (Hamamah & Haouzi, 2011; Haouzi, Mahmoud, et al., 2009). The Significant Analysis of microarrays and *t*-test (paired sample analysis) were used to select genes with an absolute fold-change >2 and a false discovery rate <0.05. Then, we performed a meta-analysis of all transcriptomic studies comparing the same cycle phases to identify a list of genes exclusive to our study (Haouzi, Mahmoud, et al., 2009; see figure below on the Win-Test gene set selection). Concomitantly, class prediction applied to microarray experiments was used to identify biomarkers that are putatively involved in endometrial receptivity (Haouzi, Mahmoud, et al., 2009). The 11 most upregulated genes identified by both approaches were included in the Win-Test.

*Quantification of the Win-Test genes by RT-qPCR:* For the Win-Test, 0.5 µg RNA from each endometrial sample was used for RT-qPCR analysis according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France), as previously described (Bissonnette et al., 2016; Haouzi et al., 2014). For qPCR, 2 µl of first strand DNA (1:5 dilution) were added to a 10 µl reaction mixture containing 0.25 µM of each primer and 5 µl of 2X LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche, Mannheim, Germany). DNA was amplified for 45 cycles with an annealing temperature of 63°C using the Light Cycler 480 detection system (Roche). Gene expression values were normalized to the expression of three housekeeping genes, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), and phosphoglycerate kinase 1 (*PGK1*) using the following formula:  $E_{\text{tested gene}}^{\Delta Ct} / E_{\text{housekeeping gene}}^{\Delta Ct}$  ( $E = 10^{-1/\text{slope}}$ ),  $\Delta Ct = Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{unknown}}$ , where E corresponds to the PCR reaction efficiency. The E value was obtained using a standard curve that varies in function of the used primers. One receptive endometrium sample from a patient in natural cycle (LH+7) was used as positive control and a non-receptive sample (LH+2) as negative control. Each sample was analysed in duplicate and multiple water blanks were included.

*The Win-Test prediction for successful implantation:* The Win-Test relevance for assessing the endometrium receptivity status was determined in the first 61 patients with RIF (mean ± SD, age: 37.1 ± 3.6 years) who underwent customized embryo transfer according to the Win-Test results. The sensitivity/specificity and the area under receiver operating characteristic (ROC) were computed to evaluate the Win-Test relevance for the pregnancy rate (31/61 patients with a positive β-hCG). The ROC analysis for pregnancy showed a significant prediction relevance with specificity of 63.3% and sensitivity of 71%, respectively (95% confidence interval: 0.51 to 0.76, p = 0.046).

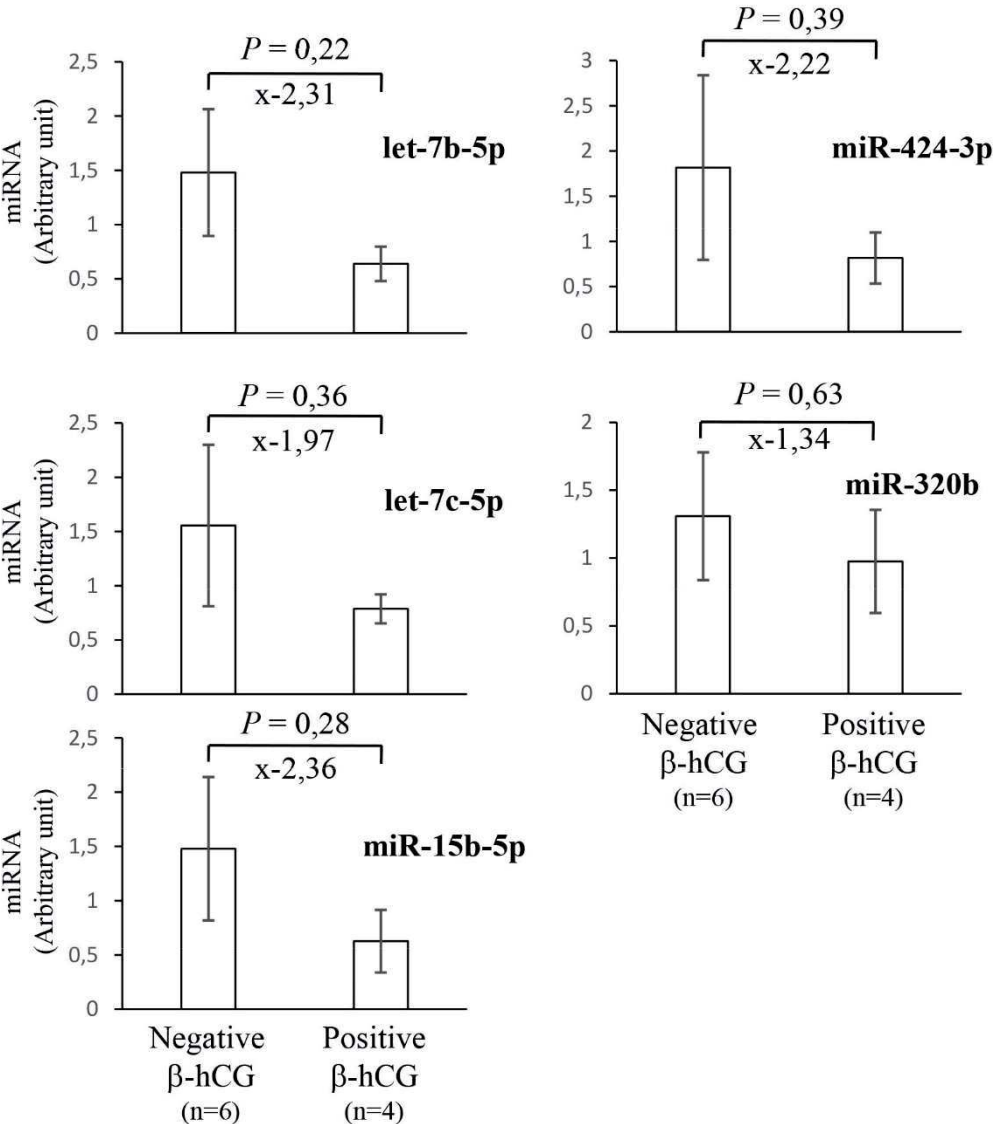


## Workflow for the Win-Test gene selection





**Supplementary Figure S2:** RT-qPCR analysis of let-7b-5p, let-7c-5p, miR-15b-5p, miR-424-3p, and miR-320b in serum samples from patients with miscarriage and life birth after customized frozen embryo transfer (validation cohort). miR-16-5p was used as housekeeping miRNA. Data are the mean  $\pm$  SEM.



**Supplementary Table 1:** Relative miRNA expression comparison measured by Affymetrix miRNA Arrays and RT-qPCR using the LightCycler 480. Fold changes and p-values were indicated. In bold, miRNAs significantly validated by RT-qPCR.

Up and down in endometrium associated with a receptive status

Name	Microarray		qPCR	
	Fold change	FDR	Fold change	p-value
miR-451a	2.01	0.013		untested
miR-1226-5p	2.43	0.023		untested
<b>miR-455-3p</b>	-2.06	0.017	-1.9	0.005
SNORD82	-2.13	0.033		untested
miR-4269	-2.77	0.035		untested
SNORD116-30	-2.35	0.03		untested
miR-1468-3p	-2.5	0.012		untested
<b>miR-4423-3p</b>	-2.7	0.01	-1.8	0.008
miR-4445-3p	-3.46	0.009	-1.6	0.24
miR-3128	-2.96	0.003	unquantifiable (Ct values > 40)	
miR-3148	-3.27	0.003	unquantifiable (Ct values > 40)	

Up in endometrium associated with implantation failure

Name	Microarray		qPCR	
	Fold change	FDR	Fold change	p-value
let-7b-5p	7.77	0.002	1.24	0.55
let-7c-5p	9.6	0.001	1.23	0.5
miR-15b-5p	4.13	0.002	0.73	0.54
miR-424-3p	5.35	0.002	0.66	0.29
miR-320b	4.63	0.001	0.83	0.74
<b>miR-152-3p</b>	5.2	0.004	1.9	0.024
<b>miR-155-5p</b>	21	0.001	2	0.026

Up in endometrium associated with miscarriage

Name	Microarray		qPCR	
	Fold change	FDR	Fold change	p-value
miR-181a-5p	5.35	0.0004	1.08	0.79
miR-574-3p	6.26	0.0003	1.21	0.6
miR-92a-3p	2.55	0.009	1.23	0.56
miR-320c	6.09	0.041	1.1	0.73
let-7d-5p	7.16	0.044	1.18	0.47

### III. Résumé des résultats

Notre étude a permis de mettre en évidence une signature endométriale des miRNA associés au statut de la réceptivité endométriale, aux échecs d'implantation et aux fausses couches précoces.

Les biopsies endométriales de 5 patientes diagnostiquées non réceptives par le *Win-test* et de 15 patientes réceptives, ont été analysées par puces Affymetrix. Cette étude est la première à avoir analysé le miRNome endométrial selon le statut de la réceptivité obtenu par le *Win-test* et non pas selon la phase du cycle menstruel. Les analyses statistiques ont révélé 11 miRNA différemment exprimés entre les deux groupes dont 2 surexprimés et 9 sous-exprimés dans l'endomètre des patientes réceptives. Deux de ces miRNA ont été validés dans une cohorte indépendante par RT-qPCR : le miR455-5P et le miR4423-3P.

Parmi les 15 patientes diagnostiquées réceptives par le *Win-test*, et après transfert embryonnaire personnalisé, 5 ont eu un dosage  $\beta$ hCG positif suivi d'une naissance vivante, 6 ont eu un échec d'implantation (dosage  $\beta$ hCG négatif) et 4 une fausse couche précoce (8-12 semaines d'aménorrhée). L'analyse du profil d'expression des miRNA le jour de la réceptivité de patientes ayant eu un échec d'implantation comparé à celles ayant eu une naissance vivante a révélé 261 miRNA différemment exprimés, majoritairement (94%) surexprimés en cas d'échec d'implantation. Deux de ces miRNA ont été validés dans une cohorte indépendante par RT-qPCR : le miR152-3P et le miR155-5P.

L'analyse des miRNA associés aux fausses couches, a permis l'identification de 76 miRNA différemment exprimés dont la majorité étaient surexprimés (88%) dans l'endomètre des patientes qui ont ultérieurement fait une fausse couche en comparaison à celles dont la grossesse a abouti à une naissance vivante. Aucun des miRNA testés par RT-qPCR n'ont pu être validés pour l'heure.

Suite à l'identification de plusieurs miRNAs différemment exprimés dans le tissu endométrial réceptif associé à une « implantation réussie » en comparaison au tissu endométrial réceptif associé à un « échec d'implantation » ultérieur, nous avons souhaité évaluer leur expression par RT-qPCR au sein du sérum prélevé le même jour que le tissu endométrial réceptif chez nos patientes ayant bénéficié d'un *Win-test* puis d'un transfert personnalisé. Parmi les 7 miRNA testés, ils semblent tous exprimés de façon similaire dans l'ensemble des échantillons, bien que certaines tendances soient observées pour le miR424-3P, miR320B, miR15B-5P, miR-let7B-5P et miR-let7C-5P (voir supplementary figure S2, page 76,

Drissenek *et al.*, 2020). Une autre stratégie pourrait être testée dans une prochaine étude pour analyser l'expression des miRNA dans le sérum (microarray, séquençage).



## Chapitre 2 : Contribution à la compréhension de la compétence embryonnaire

### I. Contexte et présentation de la publication

Lors de sa culture *in vitro* en laboratoire, l'embryon est soumis à de nombreux facteurs exogènes pouvant générer du stress : la température, le pH, l'oxygène et le milieu de culture constituent une liste non exhaustive des éléments pouvant perturber son développement précoce. Or, un embryon de bonne qualité est nécessaire à son implantation dans un endomètre réceptif. Une des solutions proposées pour améliorer les taux de succès en FIV serait de mimer les conditions physiologiques pendant la culture *in vitro* (« *back to nature* »).

La concentration en oxygène est l'une des pistes actuellement étudiée pour améliorer le développement embryonnaire précoce humain *in vitro*. Le laboratoire d'AMP du CHU de Montpellier utilisait une concentration monophasique à 5% d'O<sub>2</sub> avant 2016, puis est passé à une culture séquentielle avec 5% d'O<sub>2</sub> de J0 à J3 puis 2% d'O<sub>2</sub> de J3 à J5/6 en 2016 afin de mimer les conditions physiologiques (Ng *et al.*, 2018).

Nous avons réalisé une étude rétrospective monocentrique afin d'évaluer l'impact de la stratégie biphasique (5-2%) comparée à la stratégie monophasique (5%) sur le développement pré-implantatoire des embryons et sur les taux cumulés de naissances vivantes en FIV.

L'objectif principal a été d'évaluer l'impact de la concentration en oxygène sur les taux de blastulation totaux et utiles comme critères de jugements principaux. L'objectif secondaire a été d'évaluer les taux cumulés de grossesse et de naissances vivantes après transfert frais et congelés selon ces deux stratégies de culture. Enfin, une étude transcriptomique sur des blastocystes humains donnés à la recherche a permis de mettre en évidence les modifications des profils transcriptomiques embryonnaires selon ces deux stratégies de culture.

### II. Article 2 (Brouillet *et al.*, accepté Scientific Reports)

## TITLE

Biphasic (5%-2%) oxygen concentration strategy significantly improves the usable blastocyst and cumulative live birth rates in *in vitro* fertilization

## AUTHORS AND AFFILIATIONS

S. Brouillet<sup>a,b,\*</sup>, C. Baron<sup>a</sup>, F. Barry<sup>a,b</sup>, A. Andreeva<sup>b</sup>, D. Haouzi<sup>a,b</sup>, A. Gala<sup>a,b</sup>, A. Ferrières-Hoa<sup>a,b</sup>, V. Loup<sup>b</sup>, T. Anahory<sup>b</sup>, N. Ranisavljevic<sup>b</sup>, L. Gaspari<sup>a,c</sup>, S. Hamamah<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup>Univ Montpellier, INSERM 1203, Développement Embryonnaire Fertilité Environnement, Montpellier, France.

<sup>b</sup>CHU Montpellier, Univ Montpellier, Département de Biologie de la Reproduction, Biologie de la Reproduction/DPI et CECOS, Montpellier, France.

<sup>c</sup>CHU Montpellier, Univ Montpellier, Unité d'Endocrinologie-Gynécologie Pédiatrique, Service de Pédiatrie, Montpellier, France.

\* Corresponding author:

Dr. Sophie BROUILLET

s-brouillet@chu-montpellier.fr

+33467335954

Service de Biologie de la Reproduction, Hôpital Arnaud de Villeneuve, CHU de Montpellier, 371 Av. du Doyen Gaston Giraud, 34090 Montpellier

## **ABSTRACT**

Oxygen (O<sub>2</sub>) concentration is approximately 5% in the fallopian tube and 2% in the uterus in humans. A “back to nature” approach could increase *in vitro* fertilization (IVF) outcomes. This hypothesis was tested in this monocentric observational retrospective study that included 120 couples who underwent two IVF cycles between 2014 and 2019. Embryos were cultured at 5% from day 0 (D0) to D5/6 (monophasic O<sub>2</sub> concentration strategy) in the first IVF cycle, and at 5% O<sub>2</sub> from D0 to D3 and 2% O<sub>2</sub> from D3 to D5/6 (biphasic O<sub>2</sub> concentration strategy) in the second IVF cycle. The total and usable blastocyst rates (44.4% vs. 54.8%, p=0.049 and 21.8% vs. 32.8%, p=0.002, respectively) and the cumulative live birth rate (17.9% vs. 44.1%, p=0.027) were significantly higher with the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration strategy. Whole transcriptome analysis of blastocysts donated for research identified 707 RNAs that were differentially expressed in function of the O<sub>2</sub> strategy (fold-change >2, p-value <0.05). These genes are mainly involved in embryo development, DNA repair, embryonic stem cell pluripotency, and implantation potential. The biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration strategy for preimplantation embryo culture could increase the “take home baby rate”, thus improving IVF cost-effectiveness and infertility management.

## **KEYWORDS**

*In vitro* fertilization, embryo, oxygen level, blastocysts, live birth rate.

## INTRODUCTION

During *in vitro* fertilization (IVF), many exogenous factors can affect human embryo development, such as light, temperature, and chemical compounds [1]. One approach to increase IVF outcomes is to improve the *in vitro* microenvironment by mimicking the *in vivo* conditions, to promote embryo development and increase the implantation potential [1, 2]. This “back to nature” approach concerns different parameters (e.g. temperature, pH, culture medium composition) [1, 3], including the gas composition inside the incubator during *in vitro* embryo culture [1, 2, 4]. Many studies provided evidence about the key role of oxygen (O<sub>2</sub>) concentration during preimplantation embryo development [2]. In the last 40 years, the majority of IVF laboratories worldwide used atmospheric ( $\approx 20\%$ ) O<sub>2</sub> concentration for preimplantation embryo culture, mainly to limit the additional costs associated with the use of low O<sub>2</sub> concentrations (e.g. requirement of a nitrogen gas system, specialized incubators, and additional quality assurance associated with oxygen sensors) [2, 5, 6]. However, a recent meta-analysis confirmed the significant increase in live birth rate when using monophasic 5% O<sub>2</sub> compared with monophasic 20% O<sub>2</sub> [5]. Therefore, a continuous level of 5% O<sub>2</sub> is currently used in most IVF laboratories for preimplantation human embryo culture [7]. Interestingly, recent data suggest that dynamic O<sub>2</sub> exposure during *in vitro* culture might represent a more physiological environment, thus potentially improving IVF outcomes [8-12]. In humans, O<sub>2</sub> concentration is approximately 5% in the fallopian tube from the fertilization stage to the cleaved embryo stage, and approximately 2% in the uterus from the morula to the blastocyst stage [8, 13, 14]. Hence, implementing a biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration strategy in IVF laboratories seems relevant, especially because of the increasing use of extended culture up to the blastocyst stage [15]. Few studies reported a significant increase of the blastocyst rates in culture with biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> compared with monophasic (5%) O<sub>2</sub> concentration [12, 16], but these results remain controversial [10]. Indeed, two studies found that the biphasic strategy led to an increase in the



total blastocyst rate [12] and the usable blastocyst rate [16]. Conversely, the third study reported similar blastocyst rates with both (monophasic and biphasic) strategies [10]. These discrepant results could be partly explained by differences in the women's age among studies. Unfortunately, no information on maternal age was available in these three publications, which is a major limitation. Indeed, embryos generated using oocytes from younger women might display higher adaption to oxidative damage [17, 18], leading to similar blastulation rates when cultured in monophasic and biphasic O<sub>2</sub> concentrations. In addition, the three studies used different definitions of usable blastulation (“>4CC” [12], “≥1A with no C inner cell mass with concurrent C trophoctoderm” [16], and “from fully compacted embryos to hatching blastocysts with a visible trophoctoderm and inner cell mass” [10]), although the 3BB threshold is usually considered as the minimal grade for blastocyst usability [19]. Moreover, they used different culture media that may include different antioxidants and free radical scavengers (no information available [12], “one-step medium Global Total” from CooperSurgical® [16], and “sequential medium” from Origio® in [10]). Furthermore, the molecular mechanisms by which the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration could improve *in vitro* embryo development and implantation potential are still unknown.

Hence, the aim of our clinical study was to evaluate the impact of biphasic (5-2%) O<sub>2</sub> concentration on IVF outcomes compared with the monophasic (5%) O<sub>2</sub> strategy during *in vitro* preimplantation embryo culture. The primary objective was to evaluate the impact of O<sub>2</sub> concentration on human *in vitro* embryo development, with total and usable blastocyst rates as endpoints. The secondary objective was to characterize the impact of O<sub>2</sub> concentration on clinical outcomes, with cumulative live birth rates (LBR) as endpoint. In addition, a transcriptomic study was performed to investigate the molecular impact of biphasic (5-2%) O<sub>2</sub> culture on human embryo gene expression.

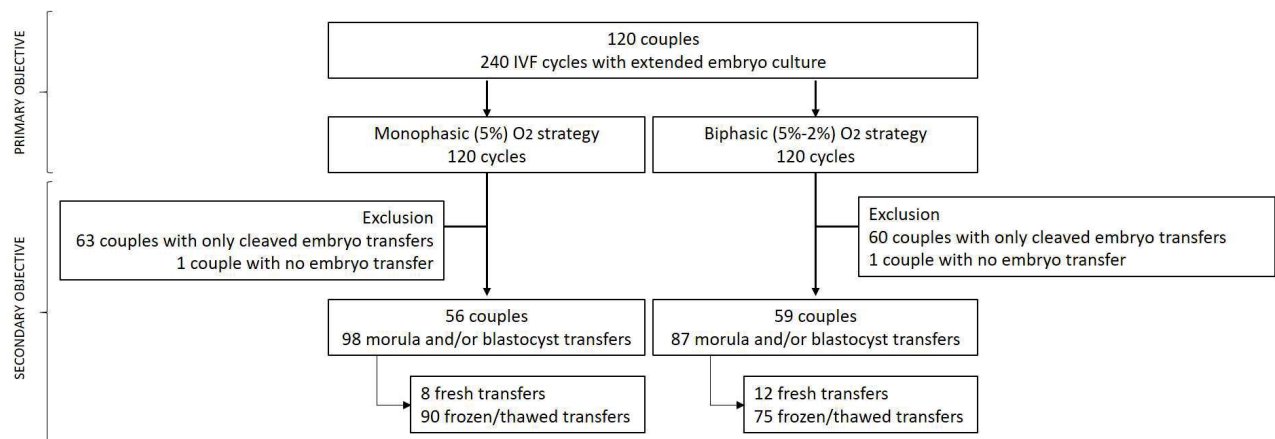
## **MATERIAL AND METHODS**

### **Ethics**

The local research ethics committee approved the retrospective collection of clinical and biological data required for the clinical study (Institutional Review Board of Montpellier University Hospital, N° 2019\_IRB-MTP\_05-12). All patients included in the clinical study signed an informed consent for the collection of their clinical and biological data. The French Agence de la Biomédecine authorized the use of donated human IVF embryos for the *in vitro* study (NOR: SSAB1816140S). For the *in vitro* study, all involved patients signed an informed consent for the donation of cryopreserved embryos and for the collection of their clinical and biological data. Non-identifying study numbers were assigned to all data. All experiments were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

### **Clinical Study Design**

This monocentric observational retrospective study was carried out at the Department of Reproductive Medicine of Montpellier University Hospital between June 2014 and March 2019. Inclusion criteria were couples undergoing IVF whose embryos were cultured in monophasic (5%) O<sub>2</sub> concentration from day (D) 0 to D6 in one IVF cycle and in biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration (i.e. 5% from D0 to D3, and then 2% from D3 to D6) in the subsequent IVF cycle. Exclusion criteria were: use of (1) testis or epididymal sperm [20-22] (2) preimplantation genetic diagnosis, (3) donor oocytes, and (4) absence of growing embryos at D3. In total, 120 couples were included for evaluating the impact of O<sub>2</sub> concentration on usable blastocyst rate (primary objective, Figure 1). To assess the impact of O<sub>2</sub> concentration on IVF outcomes (cumulative LBR; secondary objective), all cleaved embryo transfers were excluded. This left 98 embryo transfers from 56 couples after culture in monophasic O<sub>2</sub> (5%), and 87 embryo transfers from 59 couples after culture in biphasic O<sub>2</sub> (5-2%) concentration (Figure 1).



**Figure 1: Study flowchart. IVF: in vitro fertilization.**

### ***IVF procedures***

#### *Ovarian stimulation, ovarian puncture, and oocyte retrieval*

Controlled ovarian hyperstimulation was obtained by pituitary downregulation with a Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) agonist (Decapeptyl®) or antagonist (Orgalutran®, Cetrotide®) associated with follicle-stimulating hormone (FSH) (Gonal F®, Puregon®, Fostimon®) or a combination of FSH and luteinizing hormone (LH) (Pergoveris®, Menopur®, Fertistart®). Serum estradiol (E2) was quantified and follicle growth was evaluated (i.e. size and number of growing follicles) by transvaginal ultrasound from day 6 of stimulation. Circulating LH and progesterone levels were quantified to evaluate the risk of spontaneous ovulation. When at least three follicles reached a mean diameter  $\geq 17$  mm, recombinant human chorionic gonadotropin (hCG) (Ovitrelle®) or a GnRH agonist (Decapeptyl®) was administered for the final oocyte maturation. Ovarian puncture was performed 35 hours after hCG/GnRH agonist injection by transvaginal ultrasound-guided needle aspiration of the follicles (Cook Medical Launches Otrieva™). This procedure was performed under conscious sedation, or occasionally under general anesthesia.

### *Gamete and embryo culture dishes*

All culture dishes were prepared at room temperature the day before use, and equilibrated overnight in incubators (Heracell™ 240i, Thermo Scientific®) at a constant temperature of  $37.0 \pm 1^\circ\text{C}$  with 5% O<sub>2</sub>, 6% carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and 89% nitrogen (N<sub>2</sub>), or with 2% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub> and 92% N<sub>2</sub>. Temperature, humidity, and gas content of the atmosphere inside the incubators were continuously controlled (external monitoring system Cobalt 2™, Oceasoftware™).

### *Gamete collection and preparation*

Cumulus-oocyte complexes (COCs) were retrieved from follicular fluid and placed in preincubated fertilization medium (G-IVF™ PLUS, Vitrolife®). They were cultured at  $37^\circ\text{C}$  under a gas mixture of 5% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub> and 89% N<sub>2</sub> until insemination or denudation. For intracytoplasmic sperm injection (ICSI), oocytes were denuded using mechanical (Stripper, CooperSurgical®) and enzymatic methods (hyaluronidase: HYASE®, Vitrolife). Each semen sample was collected by masturbation in a sterile container after 2 days of abstinence. Sperm was prepared by density gradient centrifugation.

### *Gamete fertilization and embryo culture*

All culture dishes (Micro-droplet Culture Dish®, Vitrolife) used from D0 to D5/6 were prepared at room temperature the day before use. After medium addition (G-IVF™ PLUS, G-1™ PLUS, G-2™ PLUS, OVOIL™, Vitrolife®), dishes were immediately placed without embryos in a CO<sub>2</sub> incubator (Heracell™ 240i, Thermo Scientific®) overnight to equilibrate to 5% or 2% O<sub>2</sub> at constant temperature ( $37.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ).

Gamete fertilization and embryo culture were performed in pre-equilibrated culture embryo dishes at 5% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub> and 89% N<sub>2</sub> (Heracell™ 240i, Thermo Scientific®) from D0 to D3 (monophasic and biphasic strategies). In conventional IVF, the fertilization of each COC was performed in a pre-equilibrated culture dish (Micro-droplet Culture Dish, Vitrolife®) by adding



3,000-3,500 progressive motile spermatozoa in 20 µl droplets of fertilization medium (G-IVF™ PLUS, Vitrolife®) covered with mineral oil (OVOIL, Vitrolife®) at 38h after oocyte maturation induction at 5% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub> and 89% N<sub>2</sub> (Heracell™ 240i, Thermo Scientific®). On D1, cumulus cells were mechanically removed (Stripper, CooperSurgical®) and each zygote was individually cultured in pre-equilibrated culture dishes (Micro-droplet Culture Dish, Vitrolife®) with 20 µl droplets of cleavage medium (G-1™ PLUS, Vitrolife) covered with mineral oil (OVOIL, Vitrolife®) at 5% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub> and 89% N<sub>2</sub> (Heracell™ 240i, Thermo Scientific®) until D3. For ICSI, spermatozoa were injected in denuded oocytes 39h after oocyte induction trigger. Each injected oocyte was individually cultured in a 20 µl droplet of cleavage medium (G-1™ PLUS, Vitrolife) covered with mineral oil (OVOIL, Vitrolife®) at 5% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub> and 89% N<sub>2</sub> (Heracell™ 240i, Thermo Scientific®) in pre-equilibrated culture dishes (Micro-droplet Culture Dish®, Vitrolife) until D3.

Extended culture was performed from D3 to D5/6. Culture dishes (Micro-droplet Culture Dish®, Vitrolife) were prepared the day before use: 20 µl droplets of blastocyst medium (G-2™ PLUS, Vitrolife) were covered with mineral oil (OVOIL, Vitrolife®) and immediately placed without embryo in a CO<sub>2</sub> incubator (Heracell™ 240i, Thermo Scientific®) overnight to equilibrate to 5% (monophasic strategy) or 2% O<sub>2</sub> (biphasic strategy). At 70-73 hours post-insemination/injection, developing cleaved embryos were placed individually in new pre-equilibrated dishes at 5% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub> and 89% N<sub>2</sub> (monophasic strategy) or at 2% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub> and 92% N<sub>2</sub> (biphasic strategy) up to D5/6 (Heracell™ 240i, Thermo Scientific®).

### ***Embryo classification and selection***

Each embryo was evaluated by two practitioners. Any embryo grading disagreement was resolved by discussion. The final decision was taken by a senior biologist. Embryo transfer and/or cryopreservation decisions were discussed and approved by a team of practitioners.

Intra- and inter-observer quality controls were carried out in the laboratory by the internal and external quality referents several times per year. Normal fertilization was confirmed 17-20 hours after insemination or injection by the presence of two pronuclei and the extrusion of the second polar body. Embryo growth was evaluated daily according to morphological and kinetic parameters. Embryo evaluation at D3 was based on the number and symmetry of blastomeres, the fragmentation percentage, the presence of multinucleated blastomeres, and the compaction degree. At D5/6, blastocyst morphology was evaluated according to the Gardner and Schoolcraft grading system [23]. Thus, in accordance with the literature, usable blastocysts were defined as full (grade 3), expanded (grade 4), partially hatched (grade 5), or fully hatched (grade 6) blastocysts with at least grade B trophectoderm quality [19]. Usable blastocysts were freshly transferred at D5 or cryopreserved at D5/6 for subsequent transfers. Early blastocysts (grade 1 or 2) at D5 were kept in culture until D6 and cryopreserved if considered as usable blastocysts at that point.

### ***Embryo transfer and cryopreservation***

The embryo transfer strategy was determined by a multidisciplinary team. Embryos were cryopreserved by vitrification and thawed following the manufacturer's recommendations (Vit Kit-Freeze and Vit Kit-Thaw, FUJIFILM Irvine Scientific - BioCare Europe™). Frozen embryo transfers were performed on natural cycle, stimulated cycle or with hormonal replacement treatment. One or two embryos were transferred into the uterus using a catheter (Inventcath Eco®). Each woman received intravaginal progesterone for luteal phase support from the day of oocyte retrieval to the  $\beta$ -hCG blood test.

### ***Definition of clinical study endpoints***

#### ***Primary objective***

The total blastocyst rate was defined as the number of blastocysts (grade 1 - 6 according to the Gardner and Schoolcraft grading system [23]) at D5/6 divided by the total number of embryos in extended culture. The usable blastocyst rate was defined as the number of usable blastocysts at D5/6 divided by the total number of embryos in extended culture.

### **Secondary objective**

For this objective, only the clinical outcomes of IVF cycles associated with fresh and frozen transfer of morulae (D4) and blastocysts (D5/6) were included. Endpoints were defined using the International glossary on infertility and fertility care [24] and the cumulative rates proposed by [25, 26]. The cumulative LBR was defined as the first live birth (i.e. a delivery associated with at least one live baby at >24 weeks of gestation) obtained after transfer of fresh and/or frozen-thawed embryos derived from a single ovum pick-up [26]. The number of live newborns per cycle was defined as the total number of live babies at >24 weeks of gestation obtained after transfer of fresh and/or frozen-thawed embryos derived from a single ovum pick-up. A completed cycle was defined as a cycle where all cryopreserved embryos had been thawed.

### **Transcriptomic study design**

As the impact of O<sub>2</sub> concentration on embryo development is highly species-specific, data from animal studies can hardly be extrapolated to humans [27]. Therefore, a transcriptomic study was performed with human IVF cryopreserved blastocysts donated for research (n=12) by eight couples. Gametes were collected, fertilized, cultured until the blastocyst stage, and cryopreserved in the laboratory following the same parameters (media, equipment, and protocols) and during the same period as the clinical study (2014-2019). All cryopreserved and thawed blastocysts (vitrification with the Vit Kit-freeze and thawing with Vit Kit-Warm, FUJIFILM Irvine Scientific) had high morphokinetic parameters. Patient data were collected from the patients' clinical records.

### ***Embryo transcriptome analysis***

For each embryo, total RNA was extracted and purified using the Qiagen RNeasy Micro Kit (Cat#74004, Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. RNA was eluted in 10µl RNase-free water and stored at -80°C until analysis. Whole transcriptome analysis was performed using the Clariom D Pico Assay (Cat#902924, ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France) that allows assessing the expression of more than 540 000 coding and non-coding transcripts, including mRNA, circRNA, lncRNA, miRNA precursors and other small RNAs, using a small amount of total RNA [28, 29]. Briefly, the Genechip Pico Reagent Kit protocol was first used to prepare hybridization-ready targets from picogram to nanogram quantities of total RNA samples. Total RNA was reverse transcribed to single-stranded cDNA containing the T7 promoter sequence at the 5' end. Double-stranded DNA was synthesized in an in-vitro-transcription (IVT) amplification reaction by adding a 3' adaptor as template. Double-stranded DNA was then used as template for antisense RNA synthesis and overnight amplification by IVT, using T7 RNA polymerase. Purified cRNA was then used for sense single-stranded cDNA (ss-cDNA) synthesis, followed by RNase H digestion and ss-cDNA magnetic bead purification. Ss-cDNA was fragmented using uracil DNA glycosylase and apurinic/aprimidinic endonuclease 1, and then labeled by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) using a proprietary DNA Labeling Reagent that is covalently linked to biotin. Finally, the hybridization cocktail was loaded into single human Clariom D arrays and incubated in the Affymetrix GeneChip Hybridization Oven 645 at 45°C, 60 rpm, for 16h. Arrays were stained using an Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450, according to the specific fluidics protocol (FS450\_0001), and scanned with an Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G. Raw intensity CEL files generated by GeneChip™command Console™ were imported into the Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0 (Applied Biosystems).

### ***Statistical analysis***



Data were reported as mean and standard deviation for quantitative data and number/percentage for qualitative data. Data normality was assessed first by visual inspection of their distribution and then with the Shapiro-Wilk test. The non-parametric t test (Mann-Whitney) was used for continuous data, and the Chi-square and Fisher's exact tests for categorical data. A p value <0.05 was considered significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Prism 5.0, GraphPad Software Inc).

Microarray data were normalized and differentially expressed coding and non-coding RNAs were identified using the Transcriptome Analysis Console (TAC) software, with the following settings: Analysis Type: Expression Gene; Summarization Method: Gene Level - RMA; Gene-Level P-value <0.05; ANOVA Method: ebayes. All genes with significant expression changes ( $p < 0.05$ ), and those with at least a two-fold change were selected.

The genetic network was generated with *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA; Ingenuity Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)). The list of differentially expressed genes was overlaid onto a global molecular network developed based on the information contained in the Ingenuity Knowledge Base.

## RESULTS

- Clinical Study
  - Primary objective

The characteristics of the couples and the biological parameters are presented in Table 1. As expected, the women's age ( $35.3 \pm 4.4$  years vs.  $33.5 \pm 4.6$  years,  $p < 0.01$ ) and total number of IVF cycles ( $2.7 \pm 1.0$  vs.  $1.6 \pm 0.9$ ,  $p < 0.01$ ) were significantly higher in the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> strategy compared with the monophasic (5%) oxygen strategy. Moreover, the total blastocyst rate was significantly higher in the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> than in the monophasic (5%) oxygen strategy (44.4% (230/518) vs. 54.8% (297/542),  $p = 0.049$ ), as well as the usable blastocyst rate

(21.8% (113/518) vs. 32.8% (178/542), p=0.002) and the usable blastocyst rate at D5 (9.1% (47/518) vs. 19.9% (108/542), p=1.53 x 10<sup>-5</sup>). All the other parameters were similar between groups.

Parameter	Monophasic (5%) O <sub>2</sub> strategy	Biphasic (5%-2%) O <sub>2</sub> strategy	p value
<b>Couples (n)/ Cycles (n)</b>	<b>120/120</b>	<b>120/120</b>	-
Women's age (years)	33.5 ± 4.6	35.3 ± 4.4	<0.01
Women's BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.7 ± 4.3	23.8 ± 4.2	0.91
Men's age (years)	36.4 ± 6.1	37.9 ± 6.1	0.06
Duration of infertility (months)	44.3 ± 29.1	43.7 ± 29.4	0.86
Total number of IVF cycles (n)	1.6 ± 0.9	2.7 ± 1.0	< 0.01
Number of women smoking (cigarettes/week)	25/120 50 ± 35	24/120 50 ± 35	1 1
Number of men smoking (cigarettes/week)	42/120 72 ± 39	42/120 75 ± 40	1 0.77
Primary dose of gonadotrophins (IU)	215.2 ± 82.9	234.2 ± 82.2	0.06
Total dose of gonadotrophins (IU)	2,274.5 ± 979.1	2,559.6 ± 1,077.3	0.06
Duration of stimulation (days)	10.4 ± 1.5	10.8 ± 1.9	0.06
Retrieved oocytes (n)	10.9 ± 5.0	11.1 ± 6.0	0.86
Oocytes (n) inseminated or injected (IVF/ICSI)	247/843	219/860	0.18
2 PN embryos at day 1 (n)	5.7 ± 3.3	5.6 ± 3.4	0.52
Embryos at day 3 (n)	6.4 ± 3.7	6.2 ± 3.8	0.49
<b>Total blastocyst rate (n, %)</b>	<b>44.4 % (230/518)</b>	<b>54.8 % (297/542)</b>	<b>0.049</b>
<b>Usable blastocyst rate (n, %)</b>	<b>21.8 % (113/518)</b>	<b>32.8 % (178/542)</b>	<b>0.002</b>
<b>Usable blastocyst rate at day 5 (n, %)</b>	<b>9.1 % (47/518)</b>	<b>19.9 % (108/542)</b>	<b>1.53 x 10<sup>-5</sup></b>
Usable blastocyst rate at day 6 (n, %)	12.7% (66/518)	12.9% (70/542)	0.94

**Table 1:** Characteristics of the couples and biological parameters of the IVF cycles used for the primary objective. Data are reported as means and standard deviations (SD). BMI: body mass index. IVF: in vitro fertilization. IU: International Unit. PN: pronuclei.

- Secondary objective

The cumulative LBR was significantly higher with the biphasic (5%-2%) than monophasic (5%) O<sub>2</sub> concentration strategy (10/56 (17.9%) vs. 26/59 (44.1%), p=0.027) (Table 2).

Parameter	Monophasic (5%) O <sub>2</sub> strategy	Biphasic (5%-2%) O <sub>2</sub> strategy	p value
<b>Couples/ Embryo Transfer Cycles (n)</b>	<b>56/98</b>	<b>59/87</b>	-
Mean number of embryo transfers per patient (mean ± SD)	1.75 ± 1.01	1.5 ± 0.69	0.22
Mean number of transferred embryos per transfer(mean ± SD)	1.2 ± 0.4	1.1 ± 0.3	0.33
Fresh/frozen-thawed embryo transfers (n)	8/90	12/75	0.22
Endometrial thickness in mm (mean ± SD)	9.33 ± 1.93	8.89 ± 1.63	0.43
<b>Cumulative live birth rate (n, %)</b>	<b>10/56 (17.9%)</b>	<b>26/59 (44.1%)</b>	<b>0.027</b>
<b>Number of live newborns per cycle n, % [min-max] per couple</b>	<b>10/56 (17.9%) [0-1]</b>	<b>30/59 (50.8%) [0-2]</b>	<b>0.009</b>
<b>Number of embryo transfers associated with at least one live birth (n, %)</b>	<b>10/98 (10.2%)</b>	<b>27/87 (31.0%)</b>	<b>0.004</b>
Gestational age of newborns in weeks (mean ± SD)	37.0 ± 2.0	35.7 ± 2.8	0.12
Birth weight of newborns in grams (mean ± SD)	3,469 ± 527	3,192 ± 578	0.11
Height of newborns in cm (mean ± SD)	51.0 ± 1.7	49.5 ± 2.1	0.35
Sex of newborns (male/female)	7/3	16/14	0.36
Completed cycles (all cryopreserved embryos used) (n, %)	56/56 (100%)	44/59 (74.6%)	0.29
Number of unused cryopreserved embryos (nb of couples)	0 (0)	38 (15)	-

**Table 2:** Clinical and biological parameters of IVF cycles used for the secondary objective (i.e. cycles associated with morula or blastocyst transfers). BMI: body mass index. IVF: in vitro fertilization. IU: International Unit. PN: pronuclei.

Similarly, the number of live newborns per cycle (10/56 (17.9%) vs. 30/59 (50.8%),  $p=0.009$ ) and the number of transfers associated with at least one live birth (10/98 (10.2%) vs. 27/87 (31.0%),  $p=0.004$ ) were significantly higher with the biphasic (5%-2%) than monophasic (5%) O<sub>2</sub> concentration strategy (Table 2). All the other parameters were similar between groups, including gestational age, birth weight and height, and sex of newborns (Table 2). At the study end, there were still 38 unused cryopreserved usable blastocysts to transfer from 15 couples in the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> group (versus 0 in the monophasic group) (Table 2). All of these 15 couples had at least one live birth.

- **Embryo transcriptome analysis**

For the transcriptome study, twelve blastocysts from eight IVF couples were analyzed: six blastocysts were cultured in monophasic (5%) O<sub>2</sub> and six in biphasic (5-2%) O<sub>2</sub> condition before cryopreservation. Table 3 shows the characteristics of patients and blastocysts.

Parameter	Monophasic (5%) O <sub>2</sub> strategy	Biphasic (5%-2%) O <sub>2</sub> strategy	p value
<b>Blastocysts (n)</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	-
Women's age (years)	37.9 ± 2.9	36.2 ± 2.2	0.39
Women's BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.7 ± 2.1	23.2 ± 2.0	0.39
Men's age (years)	37.9 ± 4.0	42.1 ± 1.7	0.05
Anti-Müllerian hormone (ng/ml)	6.3 ± 6.0	4.4 ± 1.7	0.64
Antral follicle count	18.0 ± 8.8	14.6 ± 1.3	0.22
Primary dose of gonadotrophins (IU)	202.4 ± 73.3	160.0 ± 22.4	0.39
Total dose of gonadotrophins (IU)	1,883.4 ± 595.6	2,040.0 ± 22.4	0.22
Duration of stimulation (days)	9.8 ± 0.8	11.6 ± 0.9	0.05
Vitrification day (day 5/day 6)	5/1	4/2	1
Blastocyst morphology (B3/B4/B5)	3/1/2	3/1/2	1

**Table 3:** *Clinical and biological parameters of the embryos donated for the transcriptomic analysis.*





C) Pie chart of the upregulated (n=663) and downregulated (n=44) transcripts in human IVF blastocysts cultured in biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration compared with monophasic (5%) O<sub>2</sub> concentration.

### **Identification of differentially expressed genes in preimplantation embryos**

The whole transcriptome analysis identified 707 RNAs that were differentially expressed in blastocysts depending on the O<sub>2</sub> strategy (Figure 2, fold-change >2, p-value <0.05). Most of these RNAs were upregulated (663/707; 93.8%; red dots in Figure 2B) in blastocysts cultured in biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration compared with those cultured in monophasic (5%) O<sub>2</sub> concentration. Conversely, 44/707 (6.2%) RNAs were downregulated in blastocysts cultured in biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> conditions. Multiple complex RNAs represented approximately 50% of the differentially expressed RNAs (Figure 2C). Coding and non-coding RNAs represented 13.12% and 17.3% of upregulated RNAs, respectively (Figure 2C). Coding and non-coding RNAs represented 6.82% and 29.5% of downregulated RNAs, respectively (Figure 2C). The top-five upregulated genes were *VNIR84P* (vomeronasal 1 receptor 84 pseudogene, x8,7-fold, p=0.0004, Multiple Complex), *SNORD14E* (small nucleolar RNA, C/D box 14E, x6.55-fold, p=4.92x10<sup>-7</sup>, Small RNA), *COX7B2* (cytochrome c oxidase subunit VIIb2, x6.29-fold, p=0.0185, Coding), *C3orf14* (chromosome 3 open reading frame 14, x5.98-fold, p=0.0062, Multiple Complex), and *DCPS* (decapping enzyme, scavenger, x5.74-fold, p=0.0042, Multiple Complex) (Table S1A). The expression of two hypoxia-induced genes [i.e. *HIGD2A* (HIG1 hypoxia inducible domain family member 2A, x2.9-fold, p=0.0067, Multiple Complex) and *HILPDA* (hypoxia inducible lipid droplet-associated), x2.2-fold, p=0.0131, Multiple Complex)] was significantly higher in blastocysts cultured in biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> than in monophasic (5%) O<sub>2</sub> concentration (Table S1B). The top-five downregulated genes were *FKBP9* (FK506 binding protein 9, x-4.4-fold, p=0.0413, Multiple Complex), *NEO1* (neogenin 1, x-3.7-fold, p=0.0116, Multiple Complex), *TOMIL1* (target of myb1 like 1 membrane

trafficking protein, x-3.04-fold, p=0.0141, Multiple Complex), *LTBP1* (latent transforming growth factor beta binding protein 1, x-2.67-fold, p=0.0042, Multiple Complex), and *KIAA0040* (*KIAA0040*, x-2.58-fold, p=0.0166, Multiple Complex) (Table S1C).

### ***Functional annotation of differentially expressed genes***

The IPA system was used for the bioinformatic analysis. IPA is a powerful analysis and search tool to evaluate the significance of “omics” data and to identify novel mechanistic pathways [30]. Analysis of the differentially expressed RNAs using IPA, as previously described [30], identified the signaling and metabolic pathways, upstream regulators, molecular interaction networks, and disease and biological functions that were most likely to be perturbed by their deregulation (Table 4 and Figure 3).

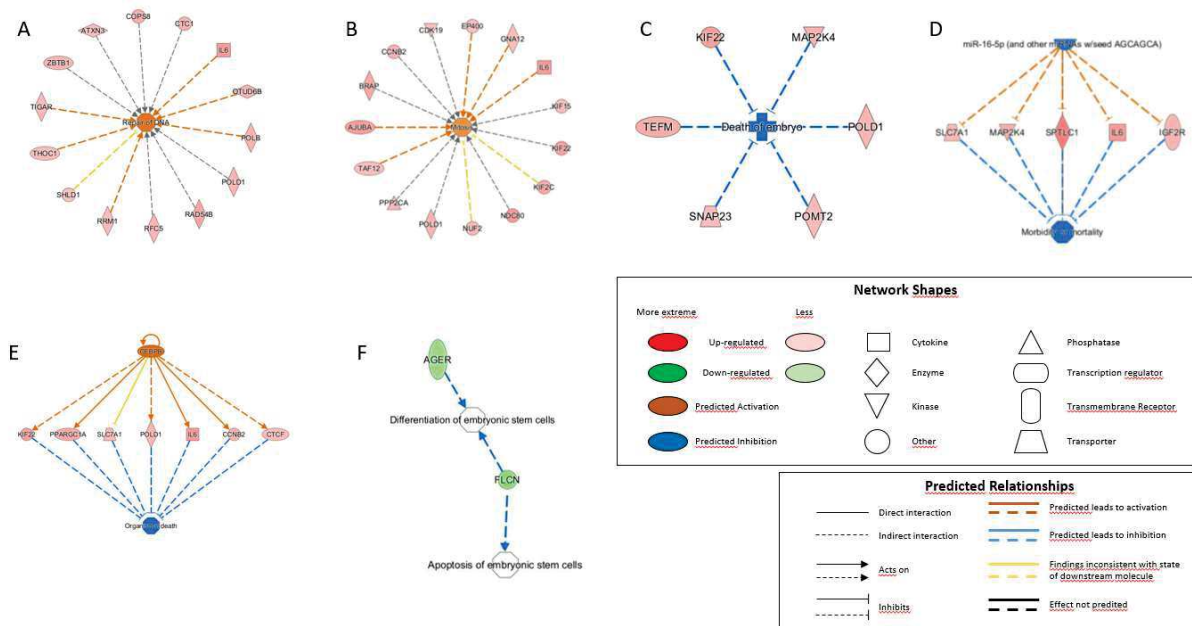
<b>A</b>	<b>Top Molecular and Cellular Functions</b>	<b>P value Range</b>	<b># Transcripts</b>	<b>Transcript names</b>
	<b>RNA Post-Transcriptional Modification</b>	8.43 x 10 <sup>-3</sup> - 2.73 x 10 <sup>-4</sup>	16	ADARB1, ATXN3, CTDTP1, DDX52, GEMIN2, INTS8, INTS9, PELP1, PPARGC1A, RBPMS, SF3B6, SNRNP27, SRSF5, SYF2, THOC1, TRNT1
	<b>Cellular Assembly and Organization</b>	1.50 x 10 <sup>-2</sup> - 3.32 x 10 <sup>-4</sup>	25	ADARB1, ATXN3, AURKC, BNIP3L, CCNB2, CTSV, DDX19B, DGUOK, DST, EHBP1, GNA12, IFT20, IL6, KIF22, KIF2C, LAMTOR1, MMS22L, NDC80, NUBPL, NUF2, PPARGC1A, PRKAA1, SMC6, SUCC3, VDACC3
	<b>DNA Replication, Recombination and Repair</b>	1.08 x 10 <sup>-2</sup> - 3.32 x 10 <sup>-4</sup>	26	ADARB1, ATXN3, AURKC, CCNB2, COPS8, CTC1, DGUOK, IL6, KIF22, KIF2C, MMS22L, NDC80, NUF2, OARD1, OTUD6B, POLB, POLD1, RAD54B, RBBP5, RFC5, RRM1, SHLD1, SMC6, THOC1, TIGAR, ZBTB1
	<b>Cell Cycle</b>	1.77 x 10 <sup>-2</sup> - 6.91 x 10 <sup>-4</sup>	22	AJUBA, AURKC, BRAP, CCNB2, CDK19, CHKA, CTCF, EP400, GNA12, IL6, KIF15, KIF22, KIF2C, NDC80, NUF2, POLD1, PPP2CA, PRKAA1, RRM1, SMC6, TAF12, ZBTB1
	<b>Cell Death and Survival</b>	1.49 x 10 <sup>-2</sup> - 6.91 x 10 <sup>-4</sup>	26	AKIP1, ATXN3, BAK1, BNIP3L, CHKA, CTH, DAPK1, EMC4, EP400, IL6, KIF15, MAP2K4, MINPP1, MMS22L, NDC80, NUF2, PPARGC1A, PP2CA, PRKAA1, RIPK1, SHLD1, SMC6, STK3, TFB1M, THOC1, TM2D1
	<b>Top Physiological System Development and Function</b>	<b>P value Range</b>	<b># Transcripts</b>	<b>Transcript names</b>
	<b>Organismal Functions</b>	1.08 x 10 <sup>-2</sup> - 3.32 x 10 <sup>-4</sup>	7	CTCF, DGUOK, IL6, MAP2K4, POMT2, PPARGC1A, PRKAA1
	<b>Digestive System Development and Function</b>	1.12 x 10 <sup>-2</sup> - 3.48 x 10 <sup>-4</sup>	10	ARV1, CTSV, DGUOK, IL6, MAP2K4, mir-597, POLB, POLD1, PPARGC1A, STK3
	<b>Hepatic System Development and Function</b>	1.12 x 10 <sup>-2</sup> - 3.48 x 10 <sup>-4</sup>	10	ARV1, DGUOK, IGF2R, IL6, MAP2K4, mir-597, POLB, POLD1, PPARGC1A, STK3

	Organ Development	1.27 x 10 <sup>-2</sup> - 3.48 x 10 <sup>-4</sup>	11	ARV1, CTSV, DGUOK, IL6, MALT1, mir-597, POLB, POLD1, PPARGC1A, PRKAA1, STK3
	Embryonic Development	1.26 x 10 <sup>-2</sup> - 3.14 x 10 <sup>-3</sup>	11	CTCF, IL6, KIF22, MALT1, MAP2K4, POLD1, POMT2, PPARGC1A, SNAP23, TEFM, THOC1
<b>B</b>	Diseases or Functions Annotation	p-value	# Transcripts	Transcripts in "Embryonic Development"
	Lack of embryoblast	3,14E-03	2	CTCF,THOC1
	Angiogenesis of cerebellum	1,08E-02	1	IL6
	Differentiation of Th22 cells	1,08E-02	1	IL6
	Development of anterior tibial muscle	1,08E-02	1	PPARGC1A
	Cellularity of mesenteric lymph node	1,08E-02	1	MALT1
	Cellularity of cervical lymph node	1,08E-02	1	MALT1
	Death of embryo	1,26E-02	6	KIF22,MAP2K4,POLD1,POMT2,SNAP23,TEFM
<b>C</b>	Disease and Functions	Consistency Scores	# Transcripts	ID Regulator
	Morbidity or mortality	2.236	5	mi-R-16-5p (and other miRNAs w/seed AGCAGCA)
	Organismal death	-3.402	7	CEBPB
<b>D</b>	Top Molecular and Cellular Functions	P value Range	# Transcripts	Transcript names
	Cellular Movement	3.92 x 10 <sup>-2</sup> - 2.18 x 10 <sup>-4</sup>	3	AGER, NEO1, SLC41A2
	Cell Death and Survival	3.65 x 10 <sup>-2</sup> - 9.06 x 10 <sup>-4</sup>	9	AGER, AMBRA1, BTBD10, CABLES1, FLCN, LTBP1, NEO1, NUP160, SLC41A2
	Cell-to-cell Signaling and Interaction	3.57 x 10 <sup>-2</sup> - 9.06 x 10 <sup>-4</sup>	4	AGER, AMBRA1, LTBP1, NEO1
	Cellular Assembly and Organization	3.04 x 10 <sup>-2</sup> - 1.81 x 10 <sup>-3</sup>	5	AGER, FLCN, KLHL15, NEO1, NUP160
	Cellular Compromise	8.13 x 10 <sup>-3</sup> - 1.81 x 10 <sup>-3</sup>	1	AGER
	Top Physiological System Development and Function			
	Skeletal and Muscular System Development and Function	4.96 x 10 <sup>-2</sup> - 2.18 x 10 <sup>-4</sup>	5	AGER, KLF11, LTBP1, NEO1, SLC41A2
	Cardiovascular System Development and Function	4.78 x 10 <sup>-2</sup> - 9.06 x 10 <sup>-4</sup>	4	AGER, KLF11, LTBP1, SLC41A2
	Nervous System Development and Function	3.74 x 10 <sup>-2</sup> - 9.06 x 10 <sup>-4</sup>	3	AGER, KLHL15, NEO1
	Organismal Development	4.96 x 10 <sup>-2</sup> - 9.06 x 10 <sup>-4</sup>	7	AGER, CABLES1, FLCN, KLF11, LTBP1, NEO1, SLC41A2



	Tissue Morphology	4.44 x 10 <sup>-2</sup> - 9.06 x 10 <sup>-4</sup>	2	AGER, LTBPI
<b>E</b>	Cell Death and Survival	P value	# Transcripts	Transcript names
	Apoptosis of embryonic stem cells	3,57E-02	1	FLCN
	Organismal Development	P value	# Transcripts	Transcript names
	Differentiation of embryonic stem cells	6,68E-03	2	AGER,FLCN

**Table 4:** Functional annotation of differentially expressed genes by Ingenuity Pathway Analysis (IPA). To investigate possible interactions of the differentially expressed RNAs, the datasets including the 663 upregulated RNAs (A, B, and C) and the 44 downregulated RNAs (D and E) in blastocysts cultured in biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration compared with monophasic (5%) O<sub>2</sub> concentration were imported in the IPA Tool to identify the top signaling pathways, functions and interactions. A general overview of the pathways linked to embryo and fetal development are presented in the table with the number and the names of transcripts from the datasets that map to each pathway. For A, B, D and E, the right-tailed Fisher's exact test was used by IPA to determine whether the biological attribute was significantly enriched in the dataset ( $p \leq 0.05$  was considered significant). For C, the two highest consistency scores are presented. The consistency score is an indicator used to describe the causal consistency of the upstream regulatory factor in the network, the dataset and dense connection metric between disease and function.



**Figure 3:** Functional annotation of the differentially expressed genes using the Ingenuity Pathway Analysis.

For the upregulated RNAs, the top-five “Molecular and Cellular Functions” included “RNA Post-Transcriptional Modification” (16 RNAs, p value range  $8.43 \times 10^{-3}$ -  $2.73 \times 10^{-4}$ ), “Cellular Assembly and Organization” (25 RNAs, p value range  $1.50 \times 10^{-2}$ -  $3.32 \times 10^{-4}$ ), “DNA Replication, Recombination and Repair” (26 RNAs, p value range  $1.08 \times 10^{-2}$ -  $3.32 \times 10^{-4}$ ), “Cell Cycle” (22 RNAs, p value range  $1.77 \times 10^{-2}$ -  $6.91 \times 10^{-4}$ ), and “Cell Death and Survival” (26 RNAs, p value range  $1.49 \times 10^{-2}$ -  $6.91 \times 10^{-4}$ ) (Table 4A). In “DNA Replication, Recombination and Repair”, 14 upregulated RNAs were associated with DNA repair ( $p=1.48 \times 10^{-3}$ ), among which six (*TIGAR*, *THOC1*, *RRM1*, *POLB*, *OTUD6B*, and *IL6*) are predicted to support DNA damage repair (Figure 3A). In “Cell Cycle”, fifteen upregulated RNAs were involved in mitosis ( $p=1.39 \times 10^{-2}$ ) among which five (*AJUBA*, *TAF12*, *IL6*, *GNA12* and *EP400*) are predicted to stimulate this process (Figure 3B). Moreover, upregulated RNAs in “Physiological System Development and Function” included genes implicated in “Organ Development” (11 RNAs, p value range  $1.27 \times 10^{-2}$ -  $3.48 \times 10^{-4}$ ) and “Embryonic

Development” (11 RNAs, p value range  $1.26 \times 10^{-2}$ -  $3.14 \times 10^{-3}$ ) (Table 4A). “Embryonic development” included *CTCF* (CCCTC-Binding Factor), *IL6* (interleukin 6), *KIF22* (kinesin family member 22), *MALTI* (MALT1 paracaspase), *MAP2K4* (mitogen-activated protein kinase 4), *POLD1* (DNA polymerase delta 1, catalytic subunit), *POMT2* (protein O-mannosyltransferase 2), *PPARGCIA* (PPARG coactivator 1 alpha), *SNAP23* (synaptosomal-associated protein 23), *TEFM* (transcription elongation factor, mitochondrial), and *THOC1* (THO complex 1) (Table 4A). *CTCF* and *THOC1* were associated with lack of embryoblast (Table 4B). *KIF22*, *MAP2K4*, *POLD1*, *POMT2*, *SNAP23*, and *TEFM* are considered to participate in embryonic death inhibition (Table 4B and Figure 3C). The two “Top Regulator Effect Networks” of the upregulated RNAs were initiated by *miR-16-5p* (Table 4C and Figure 3D) and *CEBPB* (Table 4C and Figure 3E). Inhibition of mirR-16-5p was predicted to stimulate *SLC7A1*, *MAP2K4*, *SPTLC1*, *IL6*, and *IGF2R*, leading to morbidity or mortality inhibition (Figure 3D). *CEBPB* upregulation might increase the expression of *KIFF22*, *PPARGCIA*, *POLD1*, *IL6*, *CCNB2*, and *CTCF*, contributing to the inhibition of organismal death (Figure 3E).

The top five “Molecular and Cellular Functions” of downregulated RNAs included “Cellular Movement” (3 RNAs, p value range  $3.92 \times 10^{-2}$ -  $2.18 \times 10^{-4}$ ), “Cell Death and Survival” (9 RNAs, p value range  $3.65 \times 10^{-2}$ -  $9.06 \times 10^{-4}$ ), “Cell-to-cell Signaling and Interaction” (4 RNAs, p value range  $3.57 \times 10^{-2}$ -  $9.06 \times 10^{-4}$ ), “Cellular Assembly and Organization” (5 RNAs, p value range  $3.04 \times 10^{-2}$ -  $1.81 \times 10^{-3}$ ), and “Cellular Compromise” (1 RNAs, p value range  $8.13 \times 10^{-3}$ -  $1.81 \times 10^{-3}$ ) (Table 4D). In “Cell Death and Survival”, *FLCN* (folliculin) is predicted to inhibit embryonic stem cell apoptosis ( $p=3.57 \times 10^{-2}$ ). In “Organismal Development”, *AGER* and *FLCN* should maintain embryonic stem cell pluripotency by inhibiting their differentiation ( $p=6.68 \times 10^{-3}$ ) (Table 4E and Figure 3F).

## DISCUSSION

Our results show that embryo culture in biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration is associated with a significant increase in total and usable blastocyst rates and also LBR compared with culture in monophasic (5%) O<sub>2</sub> concentration. This suggest that mimicking the physiological O<sub>2</sub> concentration during extended human embryo culture could increase IVF outcomes and improve the management of infertile couples. Moreover, O<sub>2</sub> concentration reduction from 5% to 2% led to a significant differential gene expression in human blastocysts, corroborating the hypothesis that controlling the embryo microenvironment during *in vitro* culture is important to optimize blastocyst development and implantation potential. Our study is the first to provide informative data on the impact of embryo culture in biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration on cumulative IVF outcomes and to identify several regulatory signaling pathways that might explain the obtained results.

In this study, the usable blastocyst rates was higher when embryos were cultured in biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration, thus increasing the number of usable blastocysts to transfer per cycle and improving IVF outcomes [31]. Moreover, the higher percentage of embryo transfers associated with at least one live birth also stresses the positive impact of the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration strategy on the blastocyst implantation competence. Our results indicate that the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration strategy increases not only the number of usable blastocysts obtained in one IVF cycle, but also improves their implantation potential. In the transcriptome study, the results of the functional annotation of the differentially expressed genes by IPA could give some clues on the underlying regulatory mechanisms. Indeed, we observed that the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration strategy influenced different key pathways involved in embryo development and implantation potential acquisition (e.g. Cellular Assembly and Organization, DNA Replication, Recombination and Repair, Cell Cycle, Cell Death and Survival, Organismal Functions, Organ Development, Embryonic development and Organ Morphology). Moreover, the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration strategy modulated the



expression of various genes that promote DNA repair, cell proliferation and embryonic stem cell pluripotency, and that inhibit embryo death and apoptosis. Although the transcriptome analysis was performed on a limited number of embryos (i.e. 12 in total, 6 for each group), it suggests that the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration strategy increases the expression of key transcripts supporting embryo growth and implantation potential. More experiments are now required to confirm these preliminary data and to determine whether these molecular candidates are the cause or the consequence of the increased blastocyst rate and LBR.

Recently, three studies compared the impact of biphasic (5%-2%) versus monophasic (5%) O<sub>2</sub> concentration strategies during human preimplantation embryo culture [10, 12, 16]. The significant increase in the total and usable blastocyst rates reported in our study is in agreement with two of these studies [12, 16], whereas the third one did not find any difference [10]. These three previous studies had major limitations, particularly they did not report key data (e.g. women's age or smoking status). Indeed, O<sub>2</sub> concentration impact on embryo development could vary in function of the women's clinical and biological parameters. For example, increasing age is associated with lower O<sub>2</sub> consumption by morulae [18] and with downregulation of pro-implantation transcript expression in blastocysts [17]. Altogether, these data suggest that embryos generated using oocytes from older women could display lower adaptive abilities, and be more sensitive to oxidative damages (particularly Reactive Oxygen Species, ROS) than embryos from younger women. This might also explain the result discrepancies in these published studies. In humans, high ROS levels in culture medium have been associated with lower fertilization and cleavage rates, higher embryonic fragmentation, lower blastocyst rate, and lower pregnancy rates in IVF cycles [32]. Yang et al. observed a positive correlation between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and DNA fragmentation level of unfertilized human oocytes and embryos [33]. Moreover, ROS increase the mitochondrial DNA mutation rate, leading to the arrest of *in vitro* embryo development [34]. Oxidative damage can cause

aggregation of cytoskeleton components and endoplasmic reticulum accumulation, resulting in the formation of inclusion bodies [35], embryo fragmentation, or development arrest [36]. One approach to limit oxidative damage is to prevent the generation of excessive free radicals by reducing O<sub>2</sub> concentration during *in vitro* embryo culture. It could be hypothesized that the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration strategy is associated with lower ROS levels, thus reducing embryo oxidative damage. More experiments are required to confirm this hypothesis.

Our study has five major strengths. First, we evaluated the same couples in both study arms for the primary objective, which minimizes the impact of patient-dependent variables, such as genetics and lifestyle. Moreover, many clinical and biological parameters (e.g. body morphology and uterine cavity) should have remained stable. Second, we studied the impact of O<sub>2</sub> concentration on 1,060 D3 embryos, which is a respectable number compared to the studies by Kaser et al (n=176 embryos, [16]) and by Morin et al (n=670 D3 embryos, [12]). Munck et al., (2018) assessed the largest embryo cohort to date (n=1,955 embryos), but they split the cohort into two studies with different protocols (n=811 for study I and n= 1,144 for study II), thus reducing the statistical power of the cohort, which becomes similar to ours [10]. Third, we used the same materials (culture media, culture dishes, and incubators) throughout the study period from June 2014 and March 2019, thus avoiding confounding factors due to different consumable brands and protocols. For example, it has been reported that the incubator type can affect the O<sub>2</sub> concentration recovery rates inside the incubator (i.e. when opening/closing the incubator door), and this could influence the embryo quality, especially at the blastocyst stage [37]. Moreover, all culture dishes with medium were systematically incubated the day before use. This is considered as the optimal procedure because few hours are needed to equilibrate the O<sub>2</sub> concentration in the droplets between the medium and the incubator atmosphere [10]. Fourth, we evaluated the cumulative LBR, which is the best indicator of the IVF cycle success [25]. The “one-and-done” approach (i.e. to obtain all the desired children by several fresh and

frozen embryo transfers generated in only one IVF cycle) is the current ultimate goal of both patients and physicians [38]. Here, we demonstrated that the shift to a biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration strategy during preimplantation embryo culture increases the chance of having a family following only one ovarian stimulation cycle and puncture. Fifth, we combined the clinical study with a transcriptome analysis of human IVF embryos the results of which allowed proposing hypotheses on the regulatory mechanisms underlying the clinical results.

Our study is also associated with several limitations. First, our study had a retrospective design. We compared embryos of the same couples, but cultured at different times. Therefore, we cannot definitely exclude the influence of confounding factors (e.g. replacement of some consumables used for embryo culture; heterogeneous quality of different culture medium batches; acquisition of technical experience) on embryo development and IVF outcomes. However, all equipment (workflows, micromanipulators, and more importantly incubators) as well as IVF/embryo culture protocols remained identical throughout the study period. Moreover, the women's age and IVF cycle rank were increased in the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration group, which is a logical consequence of the study design. Indeed, the same couples were enrolled for two successive IVF cycles, and embryo culture in biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration was always done in the subsequent cycle. However, the increasing maternal age and IVF cycle rank are expected to have negative impacts on embryo development and LBR [39-42], and therefore cannot explain the higher blastocyst rates in the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration group. Therefore, this limitation should not question the interest of our results, and our study still provides some knowledge on the subject. Second, the use of morphological/kinetic parameters to evaluate the blastocyst rates and to select embryo to transfer and cryopreserve is associated with a limited repeatability/reproducibility, implying that the result might be different in other clinics. Moreover, the definition of "usable blastocyst" is highly variable among IVF clinics, as illustrated by the three different definitions used in the

previous studies (“>4CC” [12], “ $\geq$ 1A with no C inner cell mass with concurrent C trophoctoderm” [16], or “from fully compacted embryos to hatching blastocysts with a visible trophoctoderm and inner cell mass” [10]. This heterogeneity could limit the extrapolation of our results. Third, there were still some unused cryopreserved embryos (n=38 from 15 couples) at the end of our study. However, all cryopreserved embryos belonged to couples with at least one live birth in the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration group, whereas all cryopreserved embryos were used in the monophasic (5%) O<sub>2</sub> concentration group. Hence, the calculation of cumulative LBR is complete. The future use of cryopreserved embryos can only lead to a maintenance or an improvement of the number of live newborns per cycle in the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration group, which suggests that this limitation does not threaten the relevance of our research.

To evaluate the value of implementing dynamic (5%-2%) O<sub>2</sub> strategy in IVF laboratories, a multicenter randomized control trial is now required. Embryo development and the clinical endpoints should be assessed using standardized definitions to optimize the study external validity. Moreover, it could be particularly interesting to measure ROS concentration and mitochondrial activity in embryos cultured in monophasic (5%) and biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration, as well as the associated epigenetic changes.



## CONCLUSION

Our results suggest that the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration strategy is associated with significantly improved IVF outcomes (higher total and usable blastocyst rates and increased cumulative LBR) compared with the monophasic (5%) O<sub>2</sub> concentration strategy. The wide implementation of the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration strategy for preimplantation embryo culture in IVF centers could increase the “take home baby rate”, improving IVF cost-effectiveness and the management of infertile couples. The characterization of the molecular mechanisms involved in the improvement of human embryo development and implantation potential when using the biphasic (5%-2%) O<sub>2</sub> concentration strategy could lead to the identification of new therapeutic molecules. Randomized control trials are now needed to robustly assess these interesting data.

## **ADDITIONAL INFORMATIONS**

### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

SB and SH contributes to the conception and design of the work. All authors contribute to the acquisition, analysis, or interpretation of data. SB, CB, FB, AA and NR contribute to the draft of the manuscript. All authors contribute to the critical revision of the manuscript for important intellectual content and approved the final version. All authors agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

### **COMPETING INTERESTS**

The authors declare no competing interests.

### **ACKNOWLEDGMENT**

We thank Elisabetta Andermarcher for the Editing work.

### **FUNDING**

The study was funded by INSERM 1203, Université de Montpellier, AMROG and Forward Research Grant Gedeon Richter.

## REFERENCES

1. Ng, K.Y.B., Mingels, R., Morgan, H., Macklon, N., and Cheong, Y. In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review. *Hum Reprod Update*. **24**, 1, 15-34 (2018).
2. Van Montfoort, A.P.A., et al. Reduced oxygen concentration during human IVF culture improves embryo utilization and cumulative pregnancy rates per cycle. *Hum Reprod Open*. **2020**, 1, hoz036 (2020).
3. Gruber, I. and Klein, M. Embryo culture media for human IVF: which possibilities exist? *J Turk Ger Gynecol Assoc*. **12**, 2, 110-7 (2011).
4. Gardner, D.K. and Kelley, R.L. Impact of the IVF laboratory environment on human preimplantation embryo phenotype. *J Dev Orig Health Dis*. **8**, 4, 418-435 (2017).
5. Nastri, C.O., et al. Low versus atmospheric oxygen tension for embryo culture in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. **106**, 1, 95-104 e17 (2016).
6. Sciorio, R. and Smith, G.D. Embryo culture at a reduced oxygen concentration of 5%: a mini review. *Zygote*. **27**, 6, 355-361 (2019).
7. Christianson, M.S., et al. Embryo catheter loading and embryo culture techniques: results of a worldwide Web-based survey. *J Assist Reprod Genet*. **31**, 8, 1029-36 (2014).
8. Morin, S.J. Reduction in oxygen tension to 2% in extended culture: a more physiologic system may mean more blastocysts available for transfer. *Fertil Steril*. **109**, 6, 1002-1003 (2018).
9. Morin, S.J. Oxygen tension in embryo culture: does a shift to 2% O<sub>2</sub> in extended culture represent the most physiologic system? *J Assist Reprod Genet*. **34**, 3, 309-314 (2017).
10. De Munck, N., et al. Influence of ultra-low oxygen (2%) tension on in-vitro human embryo development. *Hum Reprod*. **34**, 2, 228-234 (2019).
11. Kaser, A., Winklmayr, M., Lepperdinger, G., and Kreil, G. The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep*. **4**, 5, 469-73 (2003).
12. Morin, S.J., et al. The LO2 trial, phase I: a paired randomized controlled trial (RCT) comparing blastulation rate in ultra-low (2%) vs. low (5%) oxygen in extended culture (EC). *Fertility and Sterility*. **108**, 3, e58-e59 (2017).
13. Yedwab, G.A., Paz, G., Homonnai, T.Z., David, M.P., and Kraicer, P.F. The temperature, pH, and partial pressure of oxygen in the cervix and uterus of women and uterus of rats during the cycle. *Fertil Steril*. **27**, 3, 304-9 (1976).
14. Ottosen, L.D., et al. Observations on intrauterine oxygen tension measured by fibre-optic microsensors. *Reprod Biomed Online*. **13**, 3, 380-5 (2006).
15. Kissin, D.M., et al. Embryo transfer practices and multiple births resulting from assisted reproductive technology: an opportunity for prevention. *Fertil Steril*. **103**, 4, 954-61 (2015).
16. Kaser, D.J., et al. Randomized controlled trial of low (5%) versus ultralow (2%) oxygen for extended culture using bipronucleate and tripronucleate human preimplantation embryos. *Fertil Steril*. **109**, 6, 1030-1037 e2 (2018).
17. McCallie, B.R., et al. Compromised global embryonic transcriptome associated with advanced maternal age. *J Assist Reprod Genet*. **36**, 5, 915-924 (2019).
18. Morimoto, N., et al. Mitochondrial oxygen consumption rate of human embryos declines with maternal age. *J Assist Reprod Genet*. **37**, 8, 1815-1821 (2020).

19. Morbeck, D.E. Blastocyst culture in the Era of PGS and FreezeAlls: Is a 'C' a failing grade? *Hum Reprod Open.* **2017**, 3, hox017 (2017).
20. Lammers, J., et al. Does sperm origin affect embryo morphokinetic parameters? *J Assist Reprod Genet.* **32**, 9, 1325-32 (2015).
21. Desai, N., et al. Azoospermia and embryo morphokinetics: testicular sperm-derived embryos exhibit delays in early cell cycle events and increased arrest prior to compaction. *J Assist Reprod Genet.* **35**, 7, 1339-1348 (2018).
22. Buran, A., et al. Evaluation of the morphokinetic parameters and development of pre-implantation embryos obtained by testicular, epididymal and ejaculate spermatozoa using time-lapse imaging system. *Andrologia.* **51**, 4, e13217 (2019).
23. Gardner, D.K., Lane, M., Stevens, J., Schlenker, T., and Schoolcraft, W.B. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* **73**, 6, 1155-8 (2000).
24. Zegers-Hochschild, F., et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Hum Reprod.* **32**, 9, 1786-1801 (2017).
25. Maheshwari, A., McLernon, D., and Bhattacharya, S. Cumulative live birth rate: time for a consensus? *Hum Reprod.* **30**, 12, 2703-7 (2015).
26. Drakopoulos, P., et al. Cumulative live birth rates in in-vitro fertilization. *Minerva Ginecol.* **71**, 3, 207-210 (2019).
27. Wale, P.L. and Gardner, D.K. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod Update.* **22**, 1, 2-22 (2016).
28. Maier, J.P., et al. Inhibition of metabotropic glutamate receptor III facilitates sensitization to alkylating chemotherapeutics in glioblastoma. *Cell Death Dis.* **12**, 8, 723 (2021).
29. Thuillier, Q. and Behm-Ansmant, I. Microarray Analysis of Whole-Transcriptome RNAs Including Non-Coding RNAs. *Methods Mol Biol.* **2300**, 143-164 (2021).
30. Das, A., et al. Skin Transcriptome of Middle-Aged Women Supplemented With Natural Herbo-mineral Shilajit Shows Induction of Microvascular and Extracellular Matrix Mechanisms. *J Am Coll Nutr.* **38**, 6, 526-536 (2019).
31. Papanikolaou, E., et al. In Freeze-All Strategy, Cumulative Live Birth Rate (CLBR) Is Increasing According to the Number of Blastocysts Formed in Women <40 Undergoing Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). *Front Endocrinol (Lausanne).* **10**, 427 (2019).
32. Bedaiwy, M.A., et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril.* **82**, 3, 593-600 (2004).
33. Yang, H.W., et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod.* **13**, 4, 998-1002 (1998).
34. Guerin, P., El Mouatassim, S., and Menezo, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update.* **7**, 2, 175-89 (2001).
35. Tarin, J.J. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Mol Hum Reprod.* **2**, 10, 717-24 (1996).
36. Noda, Y., et al. Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. *Fertil Steril.* **62**, 5, 1022-7 (1994).
37. Fujiwara, M., et al. Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after in-vitro fertilization: comparison of top-load mini incubator and conventional front-load incubator. *J Assist Reprod Genet.* **24**, 1, 5-9 (2007).



38. Vaughan, D.A., et al. How many oocytes are optimal to achieve multiple live births with one stimulation cycle? The one-and-done approach. *Fertil Steril*. **107**, 2, 397-404 e3 (2017).
39. Gleicher, N., Kushnir, V.A., Albertini, D.F., and Barad, D.H. Improvements in IVF in women of advanced age. *J Endocrinol*. **230**, 1, F1-6 (2016).
40. Khalife, D., et al. Cumulative Live-Birth Rates by Maternal Age after One or Multiple In Vitro Fertilization Cycles: An Institutional Experience. *Int J Fertil Steril*. **14**, 1, 34-40 (2020).
41. Lebovitz, O., et al. The expected cumulative incidence of live birth for patients starting IVF treatment at age 41 years or older. *Reprod Biomed Online*. **37**, 5, 533-541 (2018).
42. Scaravelli, G., et al. Contribution of cryopreservation to the cumulative live birth rate: a large multicentric cycle-based data analysis from the Italian National Registry. *J Assist Reprod Genet*. **36**, 11, 2287-2295 (2019).

A					
ID	Fold Change in blastocysts cultured with biphasic strategy compared with monophasic strategy	P-val	Gene Symbol	Description	Group
TC1900010157.hg.1	8.7	0.0004	VN1R84P	vomeronal 1 receptor 84 pseudogene	Multiple_Complex
TC1100012614.hg.1	6.55	0.000000492	SNORD14E	small nucleolar RNA, C/D box 14E	Small_RNA
TC0400010601.hg.1	6.29	0.0185	COX7B2	cytochrome c oxidase subunit VIIb2	Coding
TC0300007657.hg.1	5.98	0.0062	C3orf14	chromosome 3 open reading frame 14	Multiple_Complex
TC1100009450.hg.1	5.74	0.0042	DCPS	decapping enzyme, scavenger	Multiple_Complex

B					
ID	Fold Change	P-val	Gene Symbol	Description	Group
TC0500009587.hg.1	2.92	0.0067	HIGD2A	HIG1 hypoxia inducible domain family, member 2A	Multiple_Complex
TC0700013458.hg.1	2.21	0.0131	HILPDA	hypoxia inducible lipid droplet-associated	Multiple_Complex

C					
ID	Fold Change	P-val	Gene Symbol	Description	Group
TC0700007132.hg.1	-4.4	0.0413	FKBP9	FK506 binding protein 9	Multiple_Complex
TC1500007814.hg.1	-3.7	0.0116	NEO1	neogenin 1	Multiple_Complex
TC1700008326.hg.1	-3.04	0.0141	TOM1L1	target of myb1 like 1 membrane trafficking protein	Multiple_Complex
TC0200007200.hg.1	-2.67	0.0042	LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1	Multiple_Complex
TC0100016476.hg.1	-2.58	0.0166	KIAA0040	KIAA0040	Multiple_Complex

**Supplementary Table S1:** List of the top-five upregulated genes (A), two hypoxia-induced genes (B), and top-five downregulated genes, calculated by Ingenuity Pathway Analysis in blastocysts cultured with the biphasic strategy compared with blastocysts cultured with the monophasic strategy.

### III. Résumé des résultats

Cette étude monocentrique rétrospective a comparé les stratégies de culture embryonnaire biphasiques (5-2%) et monophasiques (5%) chez 120 couples pris en charge en FIV. Chaque couple a réalisé une première tentative avec la culture embryonnaire monophasique puis une seconde tentative en cas d'échec ou de succès en culture biphasique. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence une augmentation des taux de blastulation totaux (44,4% vs 54,8%,  $p=0.049$ ) et blastocystes utiles (21,8% vs 32,8%,  $p=0.002$ ). Le taux de blastulation total correspond au nombre de blastocystes (stade 1 à 6 par la classification de Gardner and Schoolcraft (Schoolcraft *et al.*, 1999) obtenus divisés par le nombre d'embryons en culture prolongée. Les embryons utiles, eux, sont définis par les blastocystes classés de 3 à 6 (Gardner and Schoolcraft) avec un TE de qualité A ou B, c'est-à-dire ayant une qualité compatible avec un transfert ou une vitrification pour un remplacement ultérieur (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011; Schoolcraft *et al.*, 1999).

Dans un second temps, les résultats des tentatives pour lesquelles une morula (J4) ou un blastocyste (J5/J6) avait été transférés ont été évalués. On observe alors une augmentation significative des taux cumulatifs de naissances vivantes (17,9% vs 44,1%,  $p=0.027$ ) lors de l'utilisation de la stratégie biphasique par rapport à l'utilisation de la stratégie monophasique.

Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents, j'ai analysé le profil transcriptomique de 12 blastocystes humains vitrifiés/réchauffés donnés à la recherche, dont six ont bénéficié d'une culture monophasique et six autres d'une culture biphasique en O<sub>2</sub>. L'analyse de leur profil transcriptomique a révélé 707 gènes différentiellement exprimés (fold-change >2, p-value <0,05) selon la stratégie de culture utilisée. Parmi eux, 93% étaient surexprimés et 7% sous exprimés dans les embryons cultivés en stratégie biphasique comparé à ceux cultivés à 5%. Les annotations fonctionnelles ont mis en évidence la stimulation de processus cellulaires clés du développement embryonnaire tels que ceux de la réparation de l'ADN, de la mitose, du développement des organes ou du développement embryonnaire dans les embryons cultivés à 5-2% d'O<sub>2</sub>.

Notre étude est la première à avoir analysé le devenir des tentatives de FIV suite au transfert d'embryons cultivés par la stratégie biphasique (5-2% d'O<sub>2</sub>). Les résultats cliniques suggèrent que la stratégie séquentielle 5-2% en O<sub>2</sub> serait en faveur du développement embryonnaire et de sa compétence à donner une naissance vivante. Des études cliniques prospectives à plus large échelle sont nécessaires pour confirmer ces résultats et évaluer l'intérêt de la mise en place de

la stratégie biphasique dans les laboratoires d'AMP. Les résultats transcriptomiques ont permis d'identifier des mécanismes de régulation qui sont en cohérence avec nos résultats. Néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre les voies de signalisation mises en place au cours de la stratégie séquentielle.



## DISCUSSION

Les résultats de ce travail ont permis de contribuer à la compréhension du dialogue embryon-endomètre. J'ai mis en évidence l'association de certains miRNA dans l'acquisition du phénotype de la réceptivité endométriale et évalué l'intérêt de leur utilisation en tant que biomarqueur invasifs et non invasifs dans la prédiction du succès de la FIV. J'ai également montré que l'utilisation de la stratégie séquentielle (5-2% d'oxygène) pendant la culture *in vitro* de l'embryon pré-implantatoire était en faveur de son développement et que cette stratégie pouvait moduler l'expression de certains gènes clés du développement embryonnaire et de l'acquisition de son potentiel implantatoire, soutenant ainsi l'hypothèse que le contrôle du microenvironnement pendant la culture embryonnaire est essentiel pour optimiser les résultats en AMP.

## I. Les miRNA, biomarqueurs de la réceptivité endométriale

Cet axe de recherche a permis de caractériser le profil des miRNA pendant la fenêtre implantatoire. Celui-ci complète les profils transcriptomiques (Haouzi *et al.*, 2009) et protéomiques (Bissonnette *et al.*, 2016) précédemment obtenus par notre équipe. A notre connaissance, notre étude est la première à avoir analysé le profil d'expression des miRNA endométriaux et circulants selon le statut de la réceptivité endométriale, obtenu grâce au *Win-test* et selon le devenir de la tentative après transfert personnalisé d'embryons cryopréservés guidé par les recommandations du *Win-test*.

### A. Les miRNA endométriaux associés au statut de la réceptivité endométriale

Nous avons identifié 11 miRNA endométriaux significativement associés au statut de la réceptivité endométriale. Deux d'entre eux étaient significativement augmentés (miR451a et miR1226-5P) et neuf étaient significativement sous exprimés (miR455-3P, SNORD82, miR4269, SNORD116-30, miR1468-3P, miR4423-3P, miR4445-3P, miR3128 et miR3148) chez les patientes réceptives comparée aux non réceptives. Au total, seul le miR455-3P avait également été rapporté dans des précédentes études évaluant l'expression des miRNA pendant la fenêtre implantatoire (Altmäe *et al.*, 2013; Kresowik *et al.*, 2014; Kuokkanen *et al.*, 2010; Rekker *et al.*, 2018; Sha *et al.*, 2011). Deux de ces études rapportaient la diminution significative de l'expression du miR-455-3P au milieu de la phase sécrétoire par rapport au début de la phase sécrétoire dans l'endomètre (Rekker *et al.*, 2018; Sha *et al.*, 2011). Nous avons validé la sous expression significative du miR-455-3P dans l'endomètre réceptif d'une cohorte indépendante de patientes par RT-qPCR. Bien que l'implication précise de ce miRNA

dans l'acquisition du phénotype de la réceptivité soit encore méconnue, de récents travaux montrent qu'il inhibe la prolifération cellulaire dans le cancer du sein chez l'humain (Wang *et al.*, 2017) et également la migration et l'invasion dans des lignées cellulaires de cancer pulmonaire (Li *et al.*, 2016). La sous expression du miR455-3P stimulerait également la transition épithélio-mésenchymateuse (Li *et al.*, 2021). Or, l'invasion trophoblastique embryonnaire nécessite une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales endométriales, transition qui est caractérisée par la polarisation des cellules et le remodelage des jonctions cellulaires (*Figure 15*) (Kolanska *et al.*, 2021). Ainsi, la sous-expression du miR-455-3P dans l'endomètre réceptif pourrait participer à l'acquisition du phénotype de la réceptivité endométriale et favoriser l'implantation en stimulant ces mécanismes cellulaires. Nous avons également validé la sous expression du miR-4423-3P (x-1.8, p=0.009) dans l'endomètre réceptif. A ce jour, ce miRNA a été peu étudié, son rôle reste donc à élucider.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux voies de régulation qui pourraient être déclenchées par la modulation de l'expression des 11 miRNA endométriaux dans l'endomètre réceptif. Pour cela, nous avons recherché les cibles potentielles de ces 11 miRNA parmi les 1 012 transcrits identifiés dans notre précédente étude transcriptomiques comme étant associés au statut de la réceptivité endométriale (Haouzi *et al.*, 2009). Tout d'abord, nous avons observé une sous expression majoritaire des miRNA associée à l'acquisition du statut de réceptivité. Cela est cohérent avec l'activation transcriptomique nécessaire à la réceptivité endométriale (Haouzi *et al.*, 2009). Neuf miRNA parmi les onze trouvés, ciblaient 221 mRNA de la signature transcriptomique, dont 209 sur exprimés et 12 sous exprimés dans l'endomètre réceptif. Les annotations fonctionnelles réalisées sur Ingenuity® de ces 221 mRNA a mis en évidence leur implication dans l'augmentation de la survie cellulaire (45/221) tout en diminuant l'apoptose (79/221), ainsi que dans les processus de vasculogénèse (45/221) et angiogénèse (47/221), tous deux augmentés dans l'endomètre réceptif. Parmi les 221 mRNA, on a pu observer la surexpression du gène S100A10 par le miR1226-5P. Or, S100A10, dont les taux d'expression en protéines et mRNA sont surexprimés dans l'endomètre pendant la fenêtre implantatoire, a été évalué comme un candidat nécessaire à la décidualisation et à la transformation sécrétoire des cellules endométriales (Bissonnette *et al.*, 2016). Les miRNA que nous avons identifiés comme associés au statut de réceptivité participeraient donc à la régulation de processus clés dans l'acquisition du phénotype réceptif.

Par ailleurs, les annotations fonctionnelles ont révélé le rôle des 221 transcrits ciblés par les 11 miRNA dans l'amélioration de la migration cellulaire (73/221) et l'invasion cellulaire (43/221) ainsi que dans la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse (6/221) et dans les mécanismes d'extravasation leucocytaire (6/221). Ces deux mécanismes mimant les processus de modification endométriale et d'invasion trophectodermale, les miRNA associés à la réceptivité endométriale participeraient également à l'amélioration des processus implantatoires.

Les miR30B et miR30D ont précédemment été identifiés comme biomarqueurs de la fenêtre implantatoire dans 5 études comparant l'expression des miRNA selon le statut de réceptivité mais ne sont pas observés dans notre étude (Altmäe *et al.*, 2013; Kresowik *et al.*, 2014; Kuokkanen *et al.*, 2010; Rekker *et al.*, 2018; Sha *et al.*, 2011). Une hypothèse serait que ces miRNA sont spécifiques de la phase du cycle menstruel mais pas du statut réceptif de l'endomètre. En effet, ils sont différentiellement exprimés entre des échantillons prélevés au milieu de la phase sécrétoire comparés à la fin de la phase proliférative ou au début de la phase sécrétoire. Dans notre étude, les biopsies endométriales non réceptives ont été prélevées à P+7 et P+8 (7 et 8 jours après le début du traitement par la progestérone (P), respectivement) et les biopsies réceptives entre P+5 et P+9. Dans les précédentes études, les fenêtres de prélèvements étaient plus ciblées (LH+2 pour le début de la phase sécrétoire et entre LH+7 et LH+9 pour le milieu de la phase sécrétoire, dans la majorité des études (Table 1, Drissenek *et al.*, page 62). De plus, les patientes de notre étude sont en cycle de traitement hormonal de substitution contrairement aux patientes incluses dans les précédentes études qui étaient sous cycle naturel. Or, le profil d'expression génique est altéré par le traitement hormonal ce qui a un impact sur l'acquisition du statut de la réceptivité endométriale (Haouzi, 2015; Ruiz-Alonso *et al.*, 2012). L'expression des miRNA est également différente entre l'endomètre d'une patiente sous cycle naturel et celui d'une femme en cycle hormonal (Sha *et al.*, 2011). Ces différences de méthode peuvent expliquer les disparités observées entre les études précédentes évaluant les miRNA de la fenêtre implantatoire en cycle naturel et notre travail axé sur les miRNA de la réceptivité endométriale en cycle hormonal de substitution.

Finalement, le profil d'expression des miRNA reflèterait le statut de la réceptivité dans l'endomètre humain. Les miRNA, et notamment le miR455-3P et le miR4423-3P, sont donc de potentiels biomarqueurs de la réceptivité et pourraient permettre d'optimiser les protocoles de FIV.

## B. Les miRNA endométriaux associés aux résultats des tentatives

La prédiction du devenir de la tentative après transfert embryonnaire reste un défi en FIV/ICSI. Nous avons identifié 261 miRNA associés aux échecs d'implantation. La majorité de ces candidats (94%) étaient surexprimés dans les échantillons endométriaux associés à un échec d'implantation. Parmi eux, 14 ont également été rapportés comme étant surexprimés dans l'endomètre de patientes RIF pendant la fenêtre d'implantation comparé à des femmes dont l'implantation était réussie : miR30d-5p, miR125b-5p, miR146a-5p, miR146b-5p, miR182-5p, miR196b-5p, miR342-3p, miR423-3p, miR424-3p, miR744-5p, miR1260b, miR3175, miR3609 (Choi *et al.*, 2016; Revel *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019) ainsi que le miR155-5p (Chen *et al.*, 2021), le plus différenciellement surexprimé dans l'endomètre des patientes ayant subi un échec d'implantation de notre étude. Nous avons validé par RT-qPCR ce dernier dans une cohorte indépendante de patientes. Le miR155 est sous exprimé dans les cellules décidualisées par rapport à des cellules non décidualisées, suggérant que sa surexpression pendant la fenêtre implantatoire pourrait être néfaste aux changements morphologiques endométriaux nécessaires aux processus implantatoires (Paul *et al.*, 2019). La surexpression du miR155-5p inhibe la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire de cellules humaines endothéliales et musculaires, suggérant que sa surexpression dans l'endomètre peut être responsable d'échec d'implantation (Chen *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019). Enfin, il a été montré que la surexpression du miR155-5p augmentait la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) néfastes pour le développement embryonnaire (Bedaiwy *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2020).

Nous avons également validé le miR152-3p, surexprimé en cas d'échec d'implantation, dans une cohorte indépendante de patientes. Chez la souris, il a été suggéré que le miR152-3P jouerait un rôle dans l'implantation embryonnaire ainsi que dans les premiers jours de grossesse. En effet, dans les cellules endométriales, l'expression de ce miRNA, induite par la progestérone, régule l'expression de GLUT3 (Nie *et al.*, 2019). Or, la présence des GLUT dans l'épithélium endométrial joue un rôle important pour maintenir la concentration glucidique du fluide utérin (Nie *et al.*, 2019).

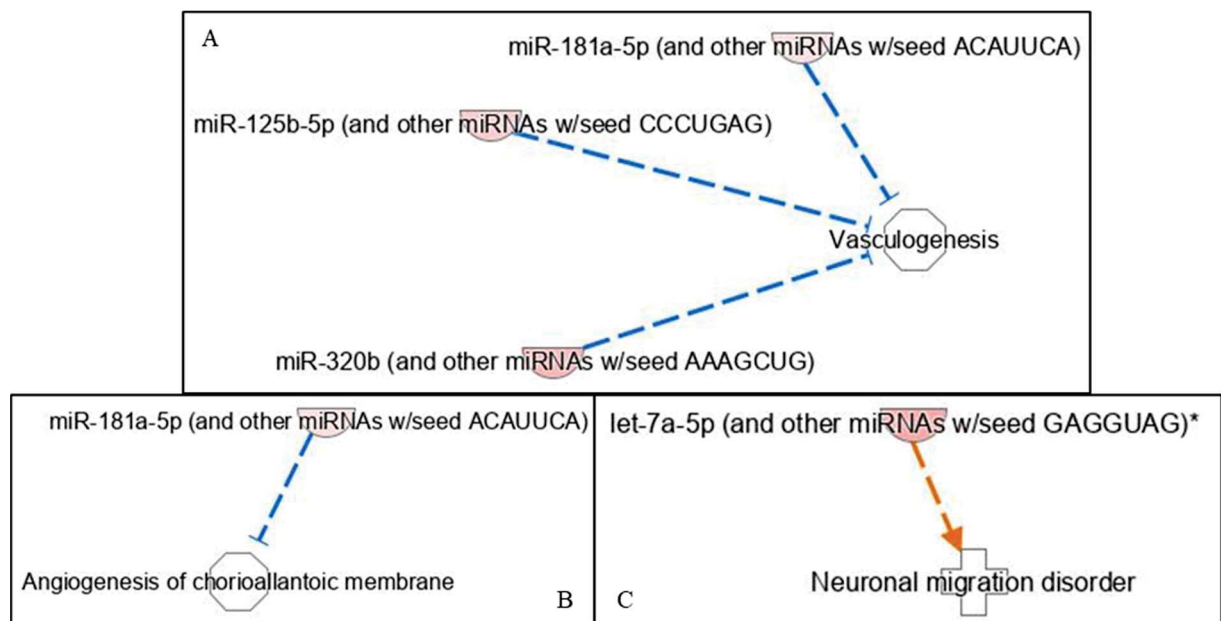
L'analyse fonctionnelle par Ingenuity® a montré que les 261 miRNA différenciellement exprimés en cas d'échec d'implantation avaient un impact sur (i) la transition épithélio-mésenchymateuse, inhibée par les miR155-5P, miR17-5P, miR193a-3P et miR200b-3P (ii) les processus d'angiogenèse inhibés chez les patientes en échec d'implantation (iii) l'apoptose,



fortement augmentés chez les patientes en échec d'implantation (iv) la prolifération, la migration et l'invasion, tous inhibés en cas d'échec (*Figure 18*). Or, les mécanismes associés à la transition épithélio-mésenchymateuse et l'angiogenèse sont indispensables à la mise en place d'un endomètre pouvant assurer l'implantation embryonnaire. De plus, la prolifération, la migration et l'invasion sont tous des mécanismes impliqués dans l'implantation embryonnaire. L'altération de ces différents mécanismes dans l'endomètre tend à expliquer en partie les échecs d'implantation. De plus, les miRNA différentiellement exprimés dans notre étude sont impliqués dans les processus nécessaires à l'implantation. Quatre miRNA de la famille 181 sont surexprimés en cas d'échec d'implantation (miR181a-5p, miR181b-5p, miR181a-2-3p, miR181c-5p). L'expression des miR181 est fortement réduite dans l'utérus murin au moment de l'implantation, et cette régulation est inversement proportionnelle à celle de la cytokine LIF (Chu *et al.*, 2015). Or, LIF est un marqueur de la décidualisation, dont l'expression est augmentée dans l'utérus des patientes en milieu et fin de phase sécrétoire pour permettre l'implantation embryonnaire (Achache and Revel, 2006). Donc la diminution d'expression du miR181 est nécessaire pour augmenter LIF au site d'implantation (Chu *et al.*, 2015). Ainsi le miR181 est impliqué dans la mise en place de l'implantation. Par ailleurs, quatre miRNA de la famille 125 sont surexprimés en cas d'échec d'implantation (miR125b-5p, miR125b-2-3p, miR125a-5p, miR125a-3p). Or, les miRNA125b altèrent l'implantation en supprimant l'expression des MMP26, impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Chen *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2017). En effet, l'inhibition des MMP26 entraîne la diminution des capacités de migration et d'invasion, restreignant ainsi l'attachement de l'embryon aux cellules endométriales (Chen *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent le rôle des miR125 dans les processus d'invasion pendant l'implantation.



fait une fausse couche, a également été associé à une augmentation des anomalies de migration neuronale, que nous pouvons supposer être une cause possible de fausses couches (*Figure 19*). La validation par qPCR dans une cohorte indépendante de patientes, de 5 miRNA sélectionnés, n'a pas permis de valider un miRNA comme biomarqueur endométrial d'une fausse couche. Les causes des fausses couches sont nombreuses et encore peu connues : les anomalies chromosomiques parentales, la consommation d'alcool, l'obésité ou encore un dysfonctionnement du système immunitaire sont des pistes non exhaustives (Larsen *et al.*, 2013). Ainsi, il est probable que les miRNA ne puissent pas être prédictifs de ce phénomène.



**Figure 19** Analyse fonctionnelle Ingenuity® des miRNA endométriaux associés aux fausses couches. A) Inhibition de la vasculogénèse par la combinaison de 3 miRNA surexprimés en cas de fausse couche ; B) Inhibition de l'angiogénèse de la membrane chorioallantoïque par le miR181a-5p, surexprimé en cas de fausse couche ; C) Activation des anomalies de migration neuronale.

Pour conclure, les miRNA associés au statut de la réceptivité endométriale et au devenir de la tentative que nous avons identifiés pourrait servir de nouveaux biomarqueurs. Cependant, des études robustes sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

### C. Les miRNA circulants

Il est maintenant bien établi que certains miRNA sont circulants et peuvent donc être détectés dans le sérum et le plasma sanguins. En effet, leur liaison aux protéines argonaute (Ago2) et leur petite taille les protègent de la dégradation dans les fluides biologiques (Arroyo *et al.*, 2011; De Guire *et al.*, 2013). Cela ouvrant de nouvelles perspectives pour le développement de tests diagnostiques non invasifs, j'ai évalué dans quelle mesure certains des miRNA endométriaux associés à la réceptivité endométriale et au devenir de la tentative pouvaient être quantifiés dans la circulation sanguine.

Pour l'heure, aucun miRNA associé à la réceptivité endométriale n'a pu être validé dans le sérum. Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus précédemment par d'autres équipes. Les résultats obtenus par Rekker *et al.* ont montré que le profil plasmatique des miRNA était constant au cours du cycle menstruel (Rekker *et al.*, 2013) et qu'aucun miRNA sanguin n'était différentiellement exprimé entre le début et le milieu de la phase sécrétoire (Rekker *et al.*, 2018). De même, une autre équipe a caractérisé l'expression de 8 miRNA par qPCR dans les exosomes du sérum de patientes prélevés pendant la phase proliférative et le milieu de la phase sécrétoire. Parmi eux, seul le miR31 s'est révélé significativement surexprimé dans l'endomètre et le sérum pendant la fenêtre implantatoire (Kresowik *et al.*, 2014). Cela suggère que les changements d'expression du miRNome endométrial seraient nécessaires à la régulation locale des gènes pendant l'acquisition du phénotype réceptif mais que cette fluctuation tissulaire ne serait pas quantifiable dans les sérums.

L'expression de 5 miRNA endométriaux associés aux échecs d'implantation a été évaluée comme étant plus abondante dans le sérum de patientes sujettes aux échecs répétés d'implantation ( $\beta$ hCG-) : miR-424-3P, miR-320b, miR-15b-5P, let-7b-5P, let-7c-5P. Les différences ne sont cependant pas significatives.

Peu d'études ont analysé le profil d'expression des miRNA circulants selon la réceptivité et le devenir de la tentative et les méthodes utilisées varient entre chacune. Premièrement, les miRNA circulants ont été dosés dans le plasma, les exosomes circulants, le sang entier ou encore le sérum selon les études (Drissenek *et al.*, 2020; Kresowik *et al.*, 2014; Rekker *et al.*, 2013, 2018; Yang *et al.*, 2018). Ensuite, nous avons pu observer la variabilité dans le nombre de patientes incluses dans chaque étude (de 9 à 114 échantillons) et souvent sans statistiques descriptives sur les caractéristiques clinico biologiques associées à chaque groupe. Cela peut

engendrer une variabilité dans les résultats obtenus. Dans notre étude, seule 10 patientes ont pu être incluses (6 sérums prélevés chez des patientes  $\beta$ hCG- et 4 de patientes  $\beta$ hCG+) et le délai de retour sur les résultats de la tentative après transfert embryonnaire représentent des facteurs limitants pour notre étude. Pour plus de robustesse, les cohortes de patients pour les études d'investigation et de validation de biomarqueurs pour une utilisation clinique doivent être précautionneusement choisies. La standardisation des cohortes est d'autant plus importante lors de l'étude des miRNA car leur expression transitoire et hautement régulée implique que le taux d'expression d'un miRNA donné pourra varier chez une même patiente en fonction du moment où l'échantillon aura été prélevé. De plus, nous avons utilisé des puces Affymetrix dans des échantillons endométriaux pour la découverte globale des miRNA puis la validation par RT-qPCR TaqMan pour la validation dans les sérums des miRNA identifiés. Or, ces deux technologies ont des fonctionnements différents et les échantillons analysés sont différents. Cela peut donc expliquer le faible nombre de miRNA que nous avons pu valider. Plusieurs critères rendent complexe l'évaluation des miRNA en tant que biomarqueur. Tout d'abord, l'expression des miRNA est souvent tissu-spécifique et un miRNA peut réguler plus d'une centaine de mRNA entraînant diverses fonctions. De plus, de récentes études ont montré que l'expression des miRNA variait selon l'âge, le sexe et l'origine ethnique des individus (Fehlmann *et al.*, 2020; Nassar *et al.*, 2014; Smith-Vikos and Slack, 2012).

Cependant, les résultats de cette étude rétrospective sont encourageants. L'inclusion d'un nombre plus important de patients permettrait d'avoir une meilleure visualisation des miRNA pouvant être à l'origine d'échecs d'implantation chez ces patientes et ainsi de pouvoir comprendre les événements initiateurs. Cela devrait permettre à plus long terme de développer un nouveau test de diagnostic non invasif pour prédire le succès de l'implantation embryonnaire.

#### D. Conclusion

En conclusion, notre travail présente de nouvelles informations pertinentes relatives à la réceptivité endométriale tant sur le plan fondamental que clinique. Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans les stratégies de prise en charge des patientes en AMP.

A plus long terme, une vision plus claire des mécanismes moléculaires de régulation de la réceptivité de l'endomètre devrait permettre d'appréhender plus facilement les défauts de la réceptivité endométriale chez les patientes présentant de multiples échecs d'implantation au



cours de procédures de FIV. En effet, les miRNA étant impliqués dans la régulation cyclique de l'endomètre, il est probable qu'une expression dérégulée de certains miRNA endométriaux pourrait affecter ses fonctions cycliques cruciales, voire même affecter l'acquisition du phénotype réceptif pendant la fenêtre implantatoire.

## II. Concentration en oxygène *in vitro* et compétence embryonnaire

Le laboratoire a mis en évidence l'intérêt d'une culture *in vitro* séquentielle à 5% d'oxygène de J0 à J3 puis à 2% d'oxygène de J3 à J5/J6 pour augmenter significativement le développement embryonnaire humain et les taux de naissances vivantes en FIV. En utilisant une approche transcriptomique, nos résultats ont permis d'identifier de potentiels mécanismes régulateurs qui pourraient participer aux résultats cliniques obtenus.

### A. La stratégie séquentielle améliore les taux de succès en FIV

Concernant l'étude clinique, les taux de blastocystes totaux (44,4% vs 54,8%, p-value = 0,049) ainsi que les taux de blastocystes utiles (21,8% vs 32,8%, p-value = 0,002) sont augmentés avec l'utilisation de la stratégie séquentielle comparé à l'utilisation de la culture monophasique pendant la culture de l'embryon préimplantatoire. Il en est de même pour le taux cumulé de naissance vivante (défini comme la première naissance d'un enfant vivant à plus de 24 semaines de grossesse après un transfert embryonnaire frais ou congelé au sein d'un même cycle de FIV avec ponction ovarienne ; 17,9% vs 44,1%, p-value = 0,027), la proportion de nouveau-nés par cycle de FIV avec ponction ovarienne (17,9% vs 50,8%, p-value = 0,009) et la proportion de transferts embryonnaires associés à au moins une naissance vivante (10,2% vs 31,0%, p-value = 0,004). Ces observations sont cohérentes avec l'augmentation des taux de blastocystes utiles observée dans l'étude clinique. En effet, le taux de blastocystes utiles par cycle est supérieur dans la stratégie séquentielle, ce qui a pour conséquence une augmentation du nombre de blastocystes à transférer en frais ou après congélation/décongélation lors d'un cycle ultérieur menant ainsi à un taux cumulé augmenté de naissances (Papanikolaou *et al.*, 2019). De façon intéressante, nous avons également noté une augmentation des transferts embryonnaires associés à au moins une naissance vivante, témoignant de l'augmentation du potentiel implantatoire intrinsèque des embryons cultivés avec la stratégie séquentielle. La stratégie séquentielle augmenterait aussi bien les chances de blastulation que le potentiel implantatoire des blastocystes obtenus.

Nous pouvons émettre deux hypothèses (potentiellement complémentaires) pour tenter d'expliquer ces résultats.

### 1. Hypothèse 1 : La stratégie séquentielle diminue l'exposition embryonnaire aux espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Dans la respiration aérobie cellulaire, l'oxygène est utilisé pour produire de l'énergie (ATP) lors de la phosphorylation oxydative dans la membrane mitochondriale interne (Zorova *et al.*, 2018). En cas de défaillance de la chaîne de transport des électrons, des électrons de haute énergie sont transférés de manière inappropriée à d'autres molécules et des radicaux libres sont générés (Trounce, 2000). Il est estimé que 2 à 3% de l'oxygène consommé par les mitochondries est incomplètement réduit menant à la génération de radicaux libres, également nommés espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS comprennent les radicaux anioniques superoxydes ( $O_2^{\bullet-}$ ), les radicaux hydroxyles ( $\bullet OH$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), les radicaux peroxydes organiques ( $RO\bullet$ ) et l'oxygène moléculaire singulet ( $^1O_2$ ). Ce sont des produits cellulaires physiologiques du métabolisme oxydatif (Houghton and Leese, 2004).

Ces ROS peuvent provoquer divers effets embryonnaires néfastes (altération de la synthèse protéique, dysfonction mitochondriales, rupture de brins d'ADN, apoptose et fragmentation) (Guérin *et al.*, 2001). Il est donc essentiel de diminuer leur production pendant la culture *in vitro* des embryons. En effet, il a été montré que de hautes concentrations en ROS dans le milieu de culture d'embryons humains était associé à de faibles taux de fécondations et de clivage (Bedaiwy *et al.*, 2004), ainsi qu'à une haute fragmentation embryonnaire (Bedaiwy *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2012), à de faibles taux de blastulation (Bedaiwy *et al.*, 2004), à une diminution du potentiel implantation embryonnaire (Lee *et al.*, 2012) et à de faibles taux de grossesse en FIV (Bedaiwy *et al.*, 2004). Une des hypothèses pouvant expliquer partiellement nos résultats serait la diminution de la production de ROS pendant la culture prolongée à 2% d' $O_2$  réduisant ainsi les dommages oxydatifs sur les embryons. Ce microenvironnement favorable contribuerait alors au succès de la blastulation ainsi qu'à l'acquisition du potentiel implantatoire.

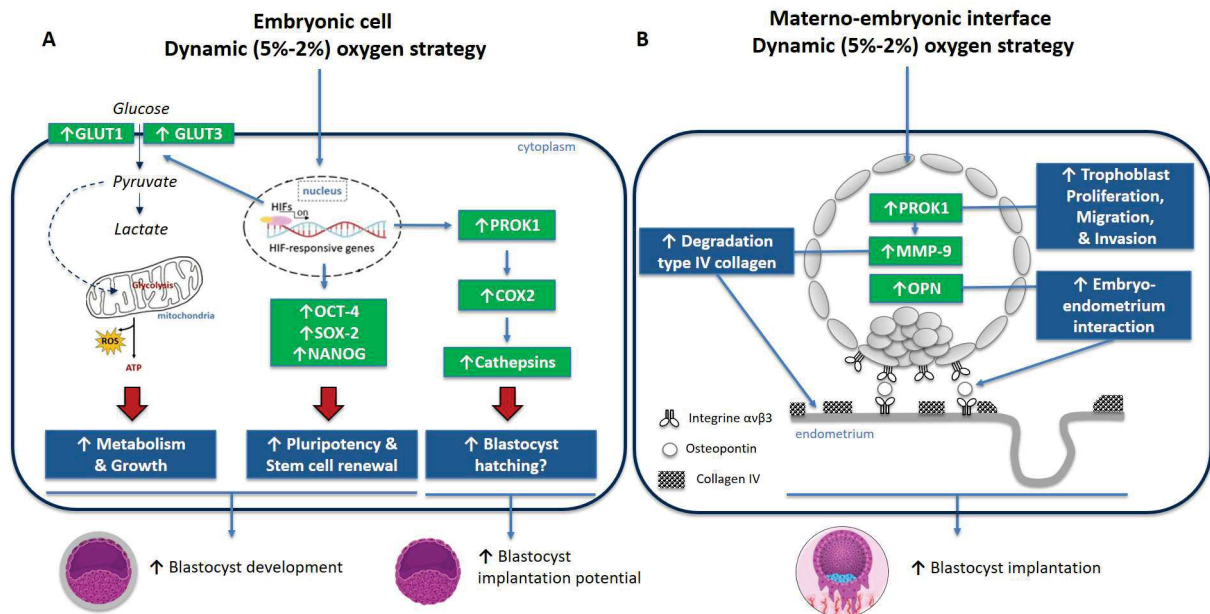
## 2. Hypothèse 2 : La stratégie séquentielle régule des gènes impliqués dans le développement et l'implantation embryonnaire

L'exposition des cellules à de faibles concentrations en oxygène favorise l'activation de facteurs de transcription induits par l'hypoxie (Hypoxia Inducible Factors ou HIF) (De Marco and Caniggia, 2002). Ces HIF se lient sur des éléments de réponse à l'hypoxie (Hypoxia Response Element ou HRE) qui modulent à leur tour l'expression d'autres gènes qui sont donc inductibles à l'hypoxie (Chang *et al.*, 2018). Parmi ces gènes, on retrouve deux transporteurs cellulaires de glucose (Glucose Transporteur type 1/3 ou GLUT1 et GLUT3) ainsi que trois marqueurs de la pluripotence (octamer-binding transcription factor 4 ou OCT4, SRY-Box Transcription Factor 2 ou SOX2 et Nanog Homeobox ou NANOG), facteurs dont la surexpression a été décrite dans les cellules souches embryonnaires humaines (hESC) soumises à l'hypoxie (Christensen *et al.*, 2015; Forristal *et al.*, 2013) (*Figure 20*). L'hypoxie pourrait également participer à l'éclosion embryonnaire grâce à l'augmentation de la sécrétion de la prokinétine 1 (PROK1) (Brouillet *et al.*, 2012), qui stimulerait à son tour la production de la cyclooxygénase 2 (COX2) (Evans *et al.*, 2008), puis l'expression des cathepsins qui participent à l'éclosion embryonnaire (Seshagiri *et al.*, 2016). Ces différents processus favoriseraient le développement embryonnaire, et pourraient donc expliquer en partie l'augmentation observée du taux de blastocystes totaux dans notre étude clinique. L'hypoxie peut également moduler des voies de signalisation impliquées dans l'implantation embryonnaire, telles que la prolifération, l'invasion, la migration ou les interactions cellulaires embryo-maternelles (notamment *via* les protéines PROK1, MMP9 ou ostéopontine (OPN)) pouvant améliorer l'implantation (*Figure 20*). La surexpression de PROK1 en conditions hypoxiques (Brouillet *et al.*, 2012) a notamment été associée à une surexpression de MMP9, enzyme de dégradation du collagène de type 4 qui est le principal composant de la matrice extracellulaire endométriale (Su *et al.*, 2017). Enfin, la surexpression de l'OPN en conditions hypoxiques (Raja *et al.*, 2014) a un rôle positif sur les adhésions cellulaires, notamment les adhésions embryo-endométriales, grâce à son interaction avec son ligand l'intégrine  $\alpha\gamma\beta3$  (Berneau *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2014).

Tous ces éléments suggèrent donc que la stratégie séquentielle en oxygène pourrait favoriser : le métabolisme énergétique, le maintien de la pluripotence, la croissance et l'éclosion de l'embryon ainsi que l'acquisition du potentiel implantatoire *via* l'augmentation des propriétés prolifératives, adhésives, migratrices et invasives du trophoctoderme (*Figure 20*).

## B. La stratégie séquentielle entraîne une activation transcriptomique embryonnaire

Pour l'étude des profils transcriptomiques embryonnaires, nous avons choisi d'utiliser les puces Clariom D car leur sensibilité élevée nous permettait d'analyser chaque embryon individuellement sans amplification préalable les transcrits et leur panel de transcrits testés était le plus complet pour analyser le transcriptome humain avec plus de 540 000 transcrits (Thermofisher, Applied Biosystem, #902922). La comparaison du transcriptome de 12 blastocystes donnés à la recherche suite à leur culture monophasique (6 blastocystes) ou séquentielle (6 blastocystes) a révélé 707 gènes différentiellement exprimés entre ces deux conditions. Il est important de noter que ces embryons donnés à la recherche ont été générés dans notre laboratoire pendant la même période que celle de notre étude clinique, bénéficiant ainsi des mêmes conditions de culture (milieu, incubateurs, techniciens, protocoles) et de congélation/décongélation (kits, protocoles). De plus, les 12 embryons provenaient de 8 couples pris en charge pour un protocole de FIV dont les caractéristiques clinico-biologiques étaient similaires entre les 2 groupes (âge maternel et paternel, IMC maternelle, AMH, CFA, doses et durée de stimulation). Le nombre de blastocystes obtenus après 5 ou 6 jours de culture étaient également similaire ainsi que la morphologie des blastocystes utilisés, suggérant que les deux groupes de blastocystes étaient comparables pour les principaux facteurs confondants. Parmi les 707 gènes différentiellement exprimés, 94% étaient surexprimés dans les blastocystes cultivés en stratégie séquentielle, suggérant que la diminution de la concentration en O<sub>2</sub> pendant la culture prolongée mènerait majoritairement à une augmentation de l'activité transcriptomique.



**Figure 20 Représentation schématique des potentiels mécanismes impactés par la stratégie séquentielle (5-2%) en oxygène pouvant expliquer les résultats cliniques obtenus.** A) Rôles de la voie de signalisation mise en place par les HIF, activés par l'hypoxie, dans le développement embryonnaire. L'hypoxie agit sur le développement embryonnaire par le biais d'éléments HIF qui se fixent sur leur éléments de réponses (hypoxia response element ou HRE), modulant alors l'expression de certains gènes tels que GLUT-1 et -3 (acteurs du métabolisme et de la croissance embryonnaire), OCT4, SOX2 et NANOG (marqueurs clés de la pluripotence) ainsi que PROK1, COX2 et les cathepsines (acteurs potentiels de l'éclosion) ; B) Rôle de la voie de signalisation mise en place par les HIF, activés par l'hypoxie, dans l'implantation embryonnaire. L'hypoxie pourrait moduler l'expression de gènes par le biais des HRE tels que PROK1 (acteur de la prolifération, migration et invasion trophoblastique), MMP9 (enzyme de dégradation du collagène IV, composant de l'endomètre) ou l'OPN (augmentant les interactions embryo-endomètre). GLUT: glucose transporter; OCT4: octamer-binding transcription factor 4; SOX2: sex determining region Y-box transcription factor 2; PROK1: prokineticin-1; COX2: cyclooxygenase 2; MMP9: matrix metalloproteinase 9; OPN: osteopontine.; HIF: Hypoxia-inducible Factors; HRE: Hypoxia Response Element

### 1. Les voies de signalisation modulées par la stratégie séquentielle

L'analyse fonctionnelle par Ingenuity® des gènes différentiellement exprimés a été réalisée séparément pour les 663 transcrits surexprimés et les 44 transcrits sous-exprimés.

Concernant l'analyse des transcrits surexprimés dans les embryons cultivés en stratégie séquentielle, 6 transcrits (TP53 Induced Glycolysis Regulatory Phosphatase ou TIGAR, THO



complex 1 ou THOC1, Ribonucleotide Reductase Catalytic Subunit M1 ou RRM1, DNA Polymerase Beta ou POLB, OTU Deubiquitinase 6B ou OTUD6B et interleukine 6 ou IL6) sont rapportés comme étant impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN et 5 autres (Ajuba LIM Protein ou AJUBA, TATA-Box Binding Protein Associated Factor 12 ou TAF12, IL6, G Protein Subunit Alpha 12 ou GNA12 et E1A Binding Protein P400 ou EP400) comme activateurs de la mitose. La mitose et les mécanismes de réparation de l'ADN étant des processus essentiels lors du développement pré-implantatoire, on peut supposer que la stimulation de ces processus dans les embryons exposés à 5% puis à 2% d'oxygène participe activement à l'augmentation des taux de blastulation observés. Par ailleurs, nous avons observé que 11 transcrits surexprimés dans la stratégie séquentielle étaient impliqués dans le développement embryonnaire : CTCF (CCCTC-Binding Factor), IL6, KIF22 (kinesin family member 22), MALT1 (MALT1 paracaspase), MAP2K4 (mitogen-activated protein kinase 4), POLD1 (DNA polymerase delta 1, catalytic subunit), POMT2 (proteine O-mannosyltransferase 2), PPARGC1A (PPARG coactivator 1 alpha), SNAP23 (synaptosomal-associated protein 23), TEFM (transcription elongation factor, mitochondrial) et THOC1. Parmi eux, 6 participent à l'inhibition de la mort embryonnaire (KIF22, MAP2K4, POLD1, POMT2, SNAP23, TEFM).

Concernant l'analyse des transcrits inhibés dans la stratégie séquentielle, nous avons notamment pu mettre en évidence que la sous expression d'AGER (advanced glycosylation end-product specific receptor) et de FLCN (folliculin) pouvaient conduire à l'inhibition de la différenciation et de l'apoptose des cellules souches embryonnaires, suggérant un maintien de la pluripotence dans la stratégie séquentielle.

## 2. Recherche de nouveaux marqueurs de la compétence embryonnaire

Parmi les 707 transcrits dont l'expression était modulée avec la stratégie séquentielle, j'ai sélectionné 5 potentiels candidats pour tenter de les valider dans une cohorte indépendante par RT-qPCR. Tout d'abord, j'ai choisi le transcrit DMXL2 dont l'expression était significativement différente entre les deux groupes et dont le facteur de surexpression était le plus élevé (Dmx like 2, fold change = 3.6, p-value =  $2.9 \times 10^{-5}$ ). Ce gène participe au maintien de l'homéostasie du glucose (Gobé *et al.*, 2019), processus essentiel pour fournir l'énergie dont l'embryon a besoin pour se développer. J'ai ensuite sélectionné HILPDA (Hypoxia Inducible Lipid Droplet Associated, fold change = 2.2, p-value = 0.013) et HIGD2A (HIG1 hypoxia inducible domain family, member 2A, fold change = 2.9, p-value = 0.007) pour l'induction de leur expression par l'hypoxie. De plus, HILPDA code pour un peptide HIG2 (Hypoxia-

inducible protein 2), activateur de la pluripotence des cellules souches embryonnaires (Abujarour *et al.*, 2010). L'augmentation de HIGD2A entraînerait une augmentation de l'enzyme cytochrome c oxydase, essentielle pour le maintien de la respiration mitochondriale cellulaire (Timón-Gómez *et al.*, 2020). Le quatrième transcrit sélectionné est STK3 (Serine/threonine kinase 3, fold change = 3.4, p-value = 0.003), dont l'expression est nécessaire au développement placentaire grâce à son rôle activateur de la différenciation trophoblastique et de la vascularisation placentaire (Du *et al.*, 2014), suggérant son implication dans le maintien de la grossesse jusqu'à terme. Parmi les candidats significativement sous-exprimés dans la stratégie séquentielle, j'ai choisi NEO1 (neogenin 1, fold change = -3.7, p-value = 0.0116) pour son niveau de dérégulation le plus bas.

De façon surprenante, nous n'avons pas retrouvé HIF1 $\alpha$  dans la liste des transcrits différenciellement exprimés alors qu'il représente pourtant un acteur clé de la régulation des gènes en condition hypoxique. Notre résultat est cohérent avec des résultats observés récemment dans des embryons préimplantatoires murins cultivés en stratégie séquentielle (5-2% O<sub>2</sub>) (Choi *et al.*, 2021). En effet, les niveaux d'expression d'HIF1 $\alpha$  étaient similaires entre leurs embryons murins cultivés à 5% de J0 à J4 et ceux cultivés à 5% d'O<sub>2</sub> de J0 au stade morula (J2) puis 2% jusqu'au stade blastocyste (J4) (Choi *et al.*, 2021). Dans la littérature, il est établi que la protéine HIF1 $\alpha$  s'accumule dans le cytoplasme puis est transloquée dans le noyau sous condition hypoxique pour induire la transcription de certains gènes (Semenza, 2000). Les auteurs ont de ce fait évalué la distribution de cette protéine dans les blastocystes murins selon leur stratégie de culture et ont ainsi observé une augmentation de la translocation nucléaire de la protéine HIF1A dans les embryons cultivés en stratégie séquentielle (Choi *et al.*, 2021). A notre connaissance, la présence de ce mécanisme n'a pas encore été évaluée dans les embryons humains cultivés en culture monophasique et séquentielle. Il serait intéressant de déterminer les taux de translocation nucléaire d'HIF1 $\alpha$  dans les blastocystes humains cultivés avec les deux stratégies et d'évaluer la participation de ce mécanisme dans l'augmentation de la blastulation et du potentiel implantatoire humain lors de prochaines expérimentations.

Nous tentons actuellement de confirmer par RT-qPCR ces premiers résultats au sein d'une cohorte embryonnaire indépendante. Pour cela, nous sommes contraints de regrouper plusieurs embryons issus de différents couples donneurs afin d'obtenir un signal suffisant en PCR. A ce jour, nous avons réalisé une étude de faisabilité sur 44 blastocystes donnés à la recherche (deux groupes de 11 blastocystes pour chaque condition de culture). On observe pour l'instant une

tendance non significative à la surexpression des gènes DMXL2, HILPDA, HIGD2A et STK3 (*Annexe 1*). Nous avons pour projet de poursuivre cette étude de faisabilité et d'augmenter le nombre de blastocystes testés afin de confirmer ou d'infirmer les modulations d'expression de ces gènes dans les deux stratégies de culture.

### 3. Comparaison avec les autres études

A notre connaissance, notre étude est la première à avoir établi le transcriptome embryonnaire humain en conditions monophasique et séquentielle. Une étude avait évalué l'expression de 6 transcrits (BCL2 Associated X protein ou BAX, GLUT1, connexine 43 ou CX43, Manganese superoxide dismutase ou MnSOD, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase ou G6PD, et HAP70.1) par RT-qPCR dans des blastocystes humains cultivés à 20% d'O<sub>2</sub> de J0 à J3 puis à 20% (n=30 embryons), 5% (n=44 embryons) ou 2% (n=46 embryons) d'O<sub>2</sub> de J3 à J5/6 (Yang *et al.*, 2016). Leurs résultats montraient des niveaux d'expression similaires pour ces transcrits dans des blastocystes cultivés à 20% puis 5% d'O<sub>2</sub> en culture prolongée en comparaison avec ceux cultivés à 20% puis 2% d'O<sub>2</sub> (Yang *et al.*, 2016). Cependant, la culture à 20% d'O<sub>2</sub> de J0 à J3 semblant délétère pour le développement embryonnaire (Nastri *et al.*, 2016), on peut supposer que cette première étape de culture bloque ou diminue l'effet positif de la concentration physiologique de 2% en O<sub>2</sub> lors de la culture prolongée. Mais cette hypothèse n'a pas été testée pour l'instant.

### C. Perspectives

La diminution de la concentration en O<sub>2</sub> lors de la culture embryonnaire préimplantatoire doit être étroitement contrôlée pour aboutir sur une augmentation du taux de blastulation et le taux de naissance vivante. En effet, une étude en 2010 a évalué l'impact du niveau de concentration d'O<sub>2</sub> pendant les premiers stades de développement embryonnaire entre J0 et J3, en comparant l'effet d'une culture embryonnaire à 5% d'O<sub>2</sub> (n=730 ovocytes fécondés) avec l'effet d'une culture à 2% d'O<sub>2</sub> (n=873 ovocytes fécondés) sur les caractéristiques des embryons clivés obtenus. Leurs résultats montrent un effet délétère de l'hyper hypoxie (2%) sur le nombre de blastomères à J3 et la qualité des embryons obtenus, sans néanmoins affecter les taux de grossesse et de fausse couche par transfert d'embryons J3 (Nakagawa *et al.*, 2010). Cela suggère que l'exposition précoce de l'embryon à des taux inférieurs à 5% d'O<sub>2</sub> serait délétère sur le développement embryonnaire avec un impact faible sur son potentiel implantatoire (Nakagawa *et al.*, 2010). Une seconde étude a évalué l'impact de la culture à 3.5% de J0 à J5/6 par rapport

à la stratégie monophasique (5%). Leurs résultats montrent une diminution du taux de blastulation total à J5 ou J6, par ovocyte fécondé (42% versus 65%,  $p < 0,0001$ ), ainsi qu'une diminution du taux d'implantation par embryon transféré (21% versus 30%,  $p = 0,0008$ ) et du taux de grossesse clinique par transfert (40% versus 52%,  $p = 0,003$ ) lorsque la culture embryonnaire était réalisée sous 3,5% d'O<sub>2</sub> (Fawzy *et al.*, 2017).

A ce jour, ces résultats suggèrent que la stratégie adaptée pour la culture des embryons humains serait la stratégie séquentielle définie comme une culture sous 5% d'O<sub>2</sub> de J0 à J3 suivi par 2% d'O<sub>2</sub> de J3 à J5/6, ce qui correspond aux concentrations physiologiques du tractus génital féminin (Ng *et al.*, 2018).

Nous souhaiterions réaliser une étude multicentrique randomisée afin d'évaluer l'intérêt de la mise en place de cette stratégie de culture au sein des laboratoires d'AMP. Les conditions de culture (pré-gazage des boîtes de culture, milieux de culture utilisés, culture prolongée de l'ensemble des embryons) ainsi que les critères de jugement utilisés (définition des blastocystes « utiles », du taux de blastulation et des issues cliniques) seraient clairement définis pour optimiser l'extrapolation des résultats obtenus dans le cadre de cette étude. De plus, nous pourrions mesurer l'impact des différentes stratégies de culture sur les taux de ROS présentes dans le milieu de culture, ainsi que l'activité mitochondriale d'embryons donnés à la recherche et cultivés selon ces deux stratégies.

La compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent l'implantation embryonnaire dans un endomètre réceptif se heurte à ce jour aux difficultés techniques, légales et éthiques des études sur l'embryon humain *in vivo* et *in vitro*. Ces obstacles nous poussent à étudier ces mécanismes sur des modèles animaux ou des modèles cellulaires *in vitro*. Nous sommes en cours de mise au point d'organoïdes d'embryon (ou embryoïdes) à partir de cellules souches placentaires (Sheridan *et al.*, 2020; Turco *et al.*, 2018) afin de disposer d'un modèle cellulaire 3D nous permettant de mimer les stades précoces de l'implantation humaine. Ce modèle, éthiquement plus acceptable, nous permettra d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu lors de la culture séquentielle (5-2% d'O<sub>2</sub>) (prolifération, survie, différenciation cellulaires). Nous avons également pour projet d'utiliser ce modèle 3D en co-culture sur des cellules endométriales décidualisées afin d'étudier plus en détail les mécanismes associés à l'apposition, adhésion et invasion des embryons humains.

#### D. Conclusion

Nos résultats suggèrent que l'utilisation de concentrations physiologiques en oxygène pendant la culture préimplantatoire des embryons humaines améliorerait les résultats en FIV. Ces données préliminaires doivent être confirmées dans une étude prospective multicentrique randomisée afin de confirmer ou d'infirmer ces premiers résultats. Des expérimentations sur des modèles cellulaires 3D humains pourraient également nous permettre de caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu et d'identifier de nouveaux candidats biomarqueurs de la compétence embryonnaire, représentant ainsi de nouvelles pistes diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques pour améliorer la prise en charge des patientes en FIV.



## CONCLUSION GENERALE

La survenue d'une grossesse nécessite une succession d'étapes comprenant la fécondation, le développement d'un embryon viable et l'implantation de celui-ci au sein de l'endomètre réceptif. Ce travail a mis en évidence de nouvelles pistes en vue d'identifier de nouveaux biomarqueurs de la survenue d'une naissance en FIV. D'une part, j'ai identifié 11 miRNA comme biomarqueurs de l'endomètre réceptif selon le *Win-test*® dont 2 ont été validés dans une cohorte indépendante de patientes (miR455-3P et miR4423-3P). J'ai également mis en évidence la modulation de l'expression de 261 miRNA dans l'endomètre réceptif selon le devenir de la tentative ("succès de l'implantation" ou "échec d'implantation") et validé 2 d'entre eux dans une cohorte indépendante de patientes (miR152-3P et le miR155-5P). Les miR455-3P, et miR4423-3P pourraient donc être de potentiels biomarqueurs de la réceptivité endométriale et les miR152-3P et miR155-5P d'échecs d'implantation.

D'autre part, j'ai mis en évidence la modulation d'expression de 707 transcrits, majoritairement surexprimés dans les blastocystes cultivés en stratégie séquentielle (5-2% d'O<sub>2</sub>) en comparaison aux embryons cultivés à 5% d'O<sub>2</sub> de J0 à J5/6. Ces gènes semblent impliqués dans des processus clés du développement embryonnaire et du potentiel implantatoire (augmentation des réparation de l'ADN, de la mitose, diminution de la mort embryonnaire et maintien de la pluripotence). Nos résultats suggèrent que l'utilisation de la stratégie séquentielle serait une piste intéressante pour améliorer les résultats en FIV.

# Bibliographie

- Abujarour, R., Efe, J. and Ding, S. 2010. Genome-wide gain-of-function screen identifies novel regulators of pluripotency. *Stem Cells*, **28**: 1487–1497.
- Achache, H. and Revel, A. 2006. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*, **12**: 731–746.
- Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. 2011. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*, **26**: 1270–1283.
- Altmäe, S., Koel, M., Võsa, U., Adler, P., Suhorutšenko, M., Laisk-Podar, T., Kukushkina, V., Saare, M., Velthut-Meikas, A., Krjutškov, K., Aghajanova, L., Lalitkumar, P.G., Gemzell-Danielsson, K., Giudice, L., Simón, C. and Salumets, A. 2017. Meta-signature of human endometrial receptivity: a meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers. *Sci Rep*, **7**: 10077.
- Altmäe, S., Martinez-Conejero, J.A., Esteban, F.J., Ruiz-Alonso, M., Stavreus-Evers, A., Horcajadas, J.A. and Salumets, A. 2013. MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reprod Sci*, **20**: 308–317.
- Altmäe, S., Reimand, J., Hovatta, O., Zhang, P., Kere, J., Laisk, T., Saare, M., Peters, M., Vilo, J., Stavreus-Evers, A. and Salumets, A. 2012. Research resource: interactome of human embryo implantation: identification of gene expression pathways, regulation, and integrated regulatory networks. *Mol. Endocrinol.*, **26**: 203–217.
- Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., Tait, J.F. and Tewari, M. 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**: 5003–5008.
- Bahmyari, S., Jamali, Z., Khatami, S.H., Vakili, O., Roozitalab, M., Savardashtaki, A., Solati, A., Mousavi, P., Shabaninejad, Z., Vakili, S., Behrouj, H., Ghasemi, H. and Movahedpour, A. 2021. microRNAs in female infertility: An overview. *Cell Biochem Funct*, doi: 10.1002/cbf.3671.
- Baron, C., Haouzi, D., Gala, A., Ferrieres-Hoa, A., Vintejeux, E., Brouillet, S. and Hamamah, S. 2021. [Endometrial receptivity in assisted reproductive techniques: An aspect to investigate in embryo implantation failure]. *Gynecol Obstet Fertil Senol*, **49**: 128–136.
- Bashiri, A., Halper, K.I. and Orvieto, R. 2018. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reprod Biol Endocrinol*, **16**: 121.
- Bedaiwy, M.A., Falcone, T., Mohamed, M.S., Aleem, A.A.N., Sharma, R.K., Worley, S.E., Thornton, J. and Agarwal, A. 2004. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril*, **82**: 593–600.
- Bergeron, C., Amant, F. and Ferenczy, A. 2006. Pathology and physiopathology of adenomyosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **20**: 511–521.
- Berneau, S.C., Ruane, P.T., Brison, D.R., Kimber, S.J., Westwood, M. and Aplin, J.D. 2019. Characterisation of Osteopontin in an In Vitro Model of Embryo Implantation. *Cells*, **8**: E432.

- Berntsen, S., Söderström-Anttila, V., Wennerholm, U.-B., Laivuori, H., Loft, A., Oldereid, N.B., Romundstad, L.B., Bergh, C. and Pinborg, A. 2019. The health of children conceived by ART: “the chicken or the egg?” *Hum Reprod Update*, **25**: 137–158.
- Bissonnette, L., Drissenek, L., Antoine, Y., Tiers, L., Hirtz, C., Lehmann, S., Perrochia, H., Bissonnette, F., Kadoch, I.-J., Haouzi, D. and Hamamah, S. 2016. Human S100A10 plays a crucial role in the acquisition of the endometrial receptivity phenotype. *Cell Adh Migr*, **10**: 282–298.
- Borthwick, J.M., Charnock-Jones, D.S., Tom, B.D., Hull, M.L., Teirney, R., Phillips, S.C. and Smith, S.K. 2003. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.*, **9**: 19–33.
- Bourdon, M., Maignien, C., Pocate-Cheriet, K., Plu Bureau, G., Marcellin, L., Patrat, C., Chapron, C. and Santulli, P. 2021. The freeze-all strategy after IVF: which indications? *Reprod Biomed Online*, **42**: 529–545.
- Broer, S.L., Mol, B.W.J., Hendriks, D. and Broekmans, F.J.M. 2009. The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril*, **91**: 705–714.
- Brouillet, S., Hoffmann, P., Feige, J.-J. and Alfaidy, N. 2012. EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. *Trends Endocrinol Metab*, **23**: 501–508.
- Buck, V.U., Gellersen, B., Leube, R.E. and Classen-Linke, I. 2015. Interaction of human trophoblast cells with gland-like endometrial spheroids: a model system for trophoblast invasion. *Hum Reprod*, **30**: 906–916.
- Carson, D.D., Lagow, E., Thathiah, A., Al-Shami, R., Farach-Carson, M.C., Vernon, M., Yuan, L., Fritz, M.A. and Lessey, B. 2002. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol. Hum. Reprod.*, **8**: 871–879.
- Chang, C.-W., Wakeland, A.K. and Parast, M.M. 2018. Trophoblast lineage specification, differentiation and their regulation by oxygen tension. *J Endocrinol*, **236**: R43–R56.
- Chen, C., Zhao, Y., Yu, Y., Li, R. and Qiao, J. 2016. MiR-125b regulates endometrial receptivity by targeting MMP26 in women undergoing IVF-ET with elevated progesterone on HCG priming day. *Sci Rep*, **6**: 25302.
- Chen, C.H., Lu, F., Yang, W.J., Yang, P.E., Chen, W.M., Kang, S.T., Huang, Y.S., Kao, Y.C., Feng, C.T., Chang, P.C., Wang, T., Hsieh, C.A., Lin, Y.C., Jen Huang, J.Y. and Wang, L.H.-C. 2021. A novel platform for discovery of differentially expressed microRNAs in patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril*, **116**: 181–188.
- Chen, L., Zheng, S.-Y., Yang, C.-Q., Ma, B.-M. and Jiang, D. 2019. MiR-155-5p inhibits the proliferation and migration of VSMCs and HUVECs in atherosclerosis by targeting AKT1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **23**: 2223–2233.
- Chen, X., Man, G.C.W., Liu, Y., Wu, F., Huang, J., Li, T.C. and Wang, C.C. 2017. Physiological and pathological angiogenesis in endometrium at the time of embryo implantation. *Am J Reprod Immunol*, **78**.

- Choi, J., Kim, W., Yoon, H., Lee, J. and Jun, J.H. 2021. Dynamic Oxygen Conditions Promote the Translocation of HIF-1 $\alpha$  to the Nucleus in Mouse Blastocysts. *Biomed Res Int*, **2021**: 5050527.
- Choi, Y., Kim, H.-R., Lim, E.J., Park, M., Yoon, J.A., Kim, Y.S., Kim, E.-K., Shin, J.-E., Kim, J.H., Kwon, H., Song, H. and Choi, D.-H. 2016. Integrative Analyses of Uterine Transcriptome and MicroRNAome Reveal Compromised LIF-STAT3 Signaling and Progesterone Response in the Endometrium of Patients with Recurrent/Repeated Implantation Failure (RIF). *PLoS ONE*, **11**: e0157696.
- Choy, J.T. and Eisenberg, M.L. 2018. Male infertility as a window to health. *Fertil Steril*, **110**: 810–814.
- Christensen, D.R., Calder, P.C. and Houghton, F.D. 2015. GLUT3 and PKM2 regulate OCT4 expression and support the hypoxic culture of human embryonic stem cells. *Sci Rep*, **5**: 17500.
- Christianson, M.S., Zhao, Y., Shoham, G., Granot, I., Safran, A., Khafagy, A., Leong, M. and Shoham, Z. 2014. Embryo catheter loading and embryo culture techniques: results of a worldwide Web-based survey. *J Assist Reprod Genet*, **31**: 1029–1036.
- Chu, B., Zhong, L., Dou, S., Wang, J., Li, J., Wang, M., Shi, Q., Mei, Y. and Wu, M. 2015. miRNA-181 regulates embryo implantation in mice through targeting leukemia inhibitory factor. *J Mol Cell Biol*, **7**: 12–22.
- Cimadomo, D., Soscia, D., Vaiarelli, A., Maggiulli, R., Capalbo, A., Ubaldi, F.M. and Rienzi, L. 2019. Looking past the appearance: a comprehensive description of the clinical contribution of poor-quality blastocysts to increase live birth rates during cycles with aneuploidy testing. *Hum. Reprod.*, **34**: 1206–1214.
- Coelho Neto, M.A., Ludwin, A., Borrell, A., Benacerraf, B., Dewailly, D., da Silva Costa, F., Condous, G., Alcazar, J.L., Jokubkiene, L., Guerriero, S., Van den Bosch, T. and Martins, W.P. 2018. Counting ovarian antral follicles by ultrasound: a practical guide. *Ultrasound Obstet Gynecol*, **51**: 10–20.
- Cohlen, B., Bijkerk, A., Van der Poel, S. and Ombelet, W. 2018. IUI: review and systematic assessment of the evidence that supports global recommendations. *Hum Reprod Update*, **24**: 300–319.
- Consensus Group, C. 2020. “There is only one thing that is truly important in an IVF laboratory: everything” Cairo Consensus Guidelines on IVF Culture Conditions. *Reprod Biomed Online*, **40**: 33–60.
- Coticchio, G., Lagalla, C., Sturmey, R., Pennetta, F. and Borini, A. 2019. The enigmatic morula: mechanisms of development, cell fate determination, self-correction and implications for ART. *Hum Reprod Update*, **25**: 422–438.
- Dahdouh, E.M., Balayla, J. and García-Velasco, J.A. 2015. Comprehensive chromosome screening improves embryo selection: a meta-analysis. *Fertil Steril*, **104**: 1503–1512.
- De Geyter, C., Calhaz-Jorge, C., Kupka, M.S., Wyns, C., Mocanu, E., Motrenko, T., Scaravelli, G., Smeenk, J., Vidakovic, S., Goossens, V., Gliozheni, O., Hambartsoumian, E., Strohmmer, H., Petrovskaya, E., Tishkevich, O., Bogaerts, K., Wyns, Christine, Balic, D., Sibincic, S., *et al.* 2020. ART in Europe, 2015: results generated from European registries by ESHRE. *Hum Reprod Open*, **2020**.



- De Guire, V., Robitaille, R., Tétreault, N., Guérin, R., Ménard, C., Bambace, N. and Sapieha, P. 2013. Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges. *Clin Biochem*, **46**: 846–860.
- De Marco, C.S. and Caniggia, I. 2002. Mechanisms of oxygen sensing in human trophoblast cells. *Placenta*, **23 Suppl A**: S58-68.
- De Munck, N., Janssens, R., Segers, I., Tournaye, H., Van de Velde, H. and Verheyen, G. 2019. Influence of ultra-low oxygen (2%) tension on in-vitro human embryo development. *Human Reproduction*, **34**: 228–234.
- Dewailly, D., Alebić, M.Š., Duhamel, A. and Stojanović, N. 2014. Using cluster analysis to identify a homogeneous subpopulation of women with polycystic ovarian morphology in a population of non-hyperandrogenic women with regular menstrual cycles. *Hum Reprod*, **29**: 2536–2543.
- Díaz-Gimeno, P., Horcajadas, J.A., Martínez-Conejero, J.A., Esteban, F.J., Alamá, P., Pellicer, A. and Simón, C. 2011. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil. Steril.*, **95**: 50–60, 60.e1–15.
- Diedrich, K., Fauser, B.C.J.M., Devroey, P., Griesinger, G., and Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group. 2007. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update*, **13**: 365–377.
- Drissenek, L., Baron, C., Brouillet, S., Entezami, F., Hamamah, S. and Haouzi, D. 2020. Endometrial miRNome profile according to the receptivity status and implantation failure. *Hum Fertil (Camb)*, 1–13.
- Du, X., Dong, Y., Shi, H., Li, J., Kong, S., Shi, D., Sun, L.V., Xu, T., Deng, K. and Tao, W. 2014. Mst1 and mst2 are essential regulators of trophoblast differentiation and placenta morphogenesis. *PLoS One*, **9**: e90701.
- Escudero, T., Ribustello, L., Sumarroca, M. and Munne, S. 2016. Next generation sequencing (NGS) and the rate of partial aneuploidy in preimplantation genetic screening (PGS). *Fertility and Sterility*, **105**: e20–e21.
- ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs, De los Santos, M.J., Apter, S., Coticchio, G., Debrock, S., Lundin, K., Plancha, C.E., Prados, F., Rienzi, L., Verheyen, G., Woodward, B. and Vermeulen, N. 2016. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). *Hum Reprod*, **31**: 685–686.
- Esteves, S.C., Roque, M., Bedoschi, G., Haahr, T. and Humaidan, P. 2018. Intracytoplasmic sperm injection for male infertility and consequences for offspring. *Nat Rev Urol*, **15**: 535–562.
- Evans, J., Catalano, R.D., Morgan, K., Critchley, H.O.D., Millar, R.P. and Jabbour, H.N. 2008. Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology*, **149**: 2877–2887.
- Evans, J., Salamonsen, L.A., Winship, A., Menkhorst, E., Nie, G., Gargett, C.E. and Dimitriadis, E. 2016. Fertile ground: human endometrial programming and lessons in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*, **12**: 654–667.
- Expert Panel on Women’s Imaging, Wall, D.J., Reinhold, C., Akin, E.A., Ascher, S.M., Brook, O.R., Dassel, M., Henrichsen, T.L., Learman, L.A., Maturen, K.E., Patlas, M.N., Robbins, J.B., Sadowski, E.A., Saphier, C., Uyeda, J.W. and Glanc, P. 2020. ACR Appropriateness Criteria® Female Infertility. *J Am Coll Radiol*, **17**: S113–S124.

- Farquhar, C.M., Bhattacharya, S., Repping, S., Mastenbroek, S., Kamath, M.S., Marjoribanks, J. and Boivin, J. 2019. Female subfertility. *Nature Reviews Disease Primers*, **5**: 1–21.
- Fawzy, M., Emad, M., AbdelRahman, M.Y., Abdelghafar, H., Abdel Hafez, F.F. and Bedaiwy, M.A. 2017. Impact of 3.5% O<sub>2</sub> culture on embryo development and clinical outcomes: a comparative study. *Fertil Steril*, **108**: 635–641.
- Fehlmann, T., Lehallier, B., Schaum, N., Hahn, O., Kahraman, M., Li, Y., Grammes, N., Geffers, L., Backes, C., Balling, R., Kern, F., Krüger, R., Lammert, F., Ludwig, N., Meder, B., Fromm, B., Maetzler, W., Berg, D., Brockmann, K., *et al.* 2020. Common diseases alter the physiological age-related blood microRNA profile. *Nat Commun*, **11**: 5958.
- Forristal, C.E., Christensen, D.R., Chinnery, F.E., Petruzzelli, R., Parry, K.L., Sanchez-Elsner, T. and Houghton, F.D. 2013. Environmental oxygen tension regulates the energy metabolism and self-renewal of human embryonic stem cells. *PLoS One*, **8**: e62507.
- Franasiak, J.M., Forman, E.J., Hong, K.H., Werner, M.D., Upham, K.M., Treff, N.R. and Scott, R.T. 2014. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril*, **101**: 656-663.e1.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B. and Bartel, D.P. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, **19**: 92–105.
- Fritz, R. and Jindal, S. 2018. Reproductive aging and elective fertility preservation. *J Ovarian Res*, **11**: 66.
- Galliano, D., Bellver, J., Díaz-García, C., Simón, C. and Pellicer, A. 2015. ART and uterine pathology: how relevant is the maternal side for implantation? *Hum Reprod Update*, **21**: 13–38.
- Gardner, D., Weissman, A., Howles, C. and Showham, Z. (eds). 2013. *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives*, 3rd ed.
- Gardner, D.K. and Balaban, B. 2016. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and “OMICS”: is looking good still important? *Mol Hum Reprod*, **22**: 704–718.
- Garry, R., Hart, R., Karthigasu, K.A. and Burke, C. 2009. A re-appraisal of the morphological changes within the endometrium during menstruation: a hysteroscopic, histological and scanning electron microscopic study. *Hum Reprod*, **24**: 1393–1401.
- Gellersen, B. and Brosens, J.J. 2014. Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure. *Endocr Rev*, **35**: 851–905.
- Glujovsky, D., Farquhar, C., Quinteiro Retamar, A.M., Alvarez Sedo, C.R. and Blake, D. 2016. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev*, CD002118.
- Gobé, C., Elzaiat, M., Meunier, N., André, M., Sellem, E., Congar, P., Jouneau, L., Allais-Bonnet, A., Naciri, I., Passet, B., Pailhoux, E. and Pannetier, M. 2019. Dual role of DMXL2 in olfactory information transmission and the first wave of spermatogenesis. *PLoS Genet*, **15**: e1007909.
- Gómez, E., Ruíz-Alonso, M., Miravet, J. and Simón, C. 2015. Human Endometrial Transcriptomics: Implications for Embryonic Implantation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **5**: a022996.

- Griswold, M.D. 2016. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev*, **96**: 1–17.
- Groff, A.F., Resetkova, N., DiDomenico, F., Sakkas, D., Penzias, A., Rinn, J.L. and Eggan, K. 2019. RNA-seq as a tool for evaluating human embryo competence. *Genome Res*, **29**: 1705–1718.
- Guérin, P., El Mouatassim, S. and Ménézo, Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, **7**: 175–189.
- Haouzi, D. 2015. Endometrial receptivity under hormone replacement therapy in oocyte-donation recipient patients: transcriptomic approach. *Medical Research Archives*, **2**.
- Haouzi, D., Entezami, F., Torre, A., Innocenti, C., Antoine, Y., Mauries, C., Vincens, C., Bringer-Deutsch, S., Gala, A., Ferrieres-Hoa, A., Ohl, J., Gonzalez Marti, B., Brouillet, S. and Hamamah, S. 2021. Customized Frozen Embryo Transfer after Identification of the Receptivity Window with a Transcriptomic Approach Improves the Implantation and Live Birth Rates in Patients with Repeated Implantation Failure. *Reprod Sci*, **28**: 69–78.
- Haouzi, D., Mahmoud, K., Fourar, M., Bendhaou, K., Dechaud, H., De Vos, J., Rème, T., Dewailly, D. and Hamamah, S. 2009. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum. Reprod.*, **24**: 198–205.
- Harton, G.L., Munné, S., Surrey, M., Grifo, J., Kaplan, B., McCulloh, D.H., Griffin, D.K., Wells, D., and PGD Practitioners Group. 2013. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertil Steril*, **100**: 1695–1703.
- Hong, K.H., Lee, H., Forman, E.J., Upham, K.M. and Scott, R.T. 2014. Examining the temperature of embryo culture in in vitro fertilization: a randomized controlled trial comparing traditional core temperature (37°C) to a more physiologic, cooler temperature (36°C). *Fertil Steril*, **102**: 767–773.
- Houghton, F.D. and Leese, H.J. 2004. Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **115 Suppl 1**: S92-96.
- Hu, S., Yao, G., Wang, Y., Xu, H., Ji, X., He, Y., Zhu, Q., Chen, Z. and Sun, Y. 2014. Transcriptomic changes during the pre-receptive to receptive transition in human endometrium detected by RNA-Seq. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **99**: E2744-2753.
- Imterat, M., Agarwal, A., Esteves, S.C., Meyer, J. and Harlev, A. 2019. Impact of Body Mass Index on female fertility and ART outcomes. *Panminerva Med*, **61**: 58–67.
- Infertility Workup for the Women’s Health Specialist: ACOG Committee Opinion, Number 781. 2019. *Obstet Gynecol*, **133**: e377–e384.
- Jiang, K., Hu, J., Luo, G., Song, D., Zhang, P., Zhu, J. and Sun, F. 2020. miR-155-5p Promotes Oxalate- and Calcium-Induced Kidney Oxidative Stress Injury by Suppressing MGP Expression. *Oxid Med Cell Longev*, **2020**: 5863617.
- Kang, Y.-J., Forbes, K., Carver, J. and Aplin, J.D. 2014. The role of the osteopontin-integrin  $\alpha\beta3$  interaction at implantation: functional analysis using three different in vitro models. *Hum Reprod*, **29**: 739–749.
- Kao, L.C., Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., Yang, J.P., Germeyer, A., Osteen, K., Taylor, R.N., Lessey, B.A. and Giudice, L.C. 2002. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*, **143**: 2119–2138.

- Kaser, D.J., Bogale, B., Sarda, V., Farland, L.V., Williams, P.L. and Racowsky, C. 2018. Randomized controlled trial of low (5%) versus ultralow (2%) oxygen for extended culture using bipronucleate and tripronucleate human preimplantation embryos. *Fertil Steril*, **109**: 1030-1037.e2.
- Khan, H.L., Bhatti, S., Suhail, S., Gul, R., Awais, A., Hamayun, H., Enver, F., Abbas, S., Hassan, Z., Nisar, R., Sardar, S. and Asif, W. 2019. Antral follicle count (AFC) and serum anti-Müllerian hormone (AMH) are the predictors of natural fecundability have similar trends irrespective of fertility status and menstrual characteristics among fertile and infertile women below the age of 40 years. *Reprod Biol Endocrinol*, **17**: 20.
- Kolanska, K., Bendifallah, S., Canlorbe, G., Mekinian, A., Touboul, C., Aractingi, S., Chabbert-Buffet, N. and Daraï, E. 2021. Role of miRNAs in Normal Endometrium and in Endometrial Disorders: Comprehensive Review. *J Clin Med*, **10**: 3457.
- Kresowik, J.D.K., Devor, E.J., Van Voorhis, B.J. and Leslie, K.K. 2014. MicroRNA-31 is significantly elevated in both human endometrium and serum during the window of implantation: a potential biomarker for optimum receptivity. *Biol. Reprod.*, **91**: 17.
- Kuokkanen, S., Chen, B., Ojalvo, L., Benard, L., Santoro, N. and Pollard, J.W. 2010. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biol. Reprod.*, **82**: 791–801.
- Larsen, E.C., Christiansen, O.B., Kolte, A.M. and Macklon, N. 2013. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med*, **11**: 154.
- Ledger, W.L. 2009. Demographics of infertility. *Reprod Biomed Online*, **18 Suppl 2**: 11–14.
- Lee, T.-H., Lee, M.-S., Liu, C.-H., Tsao, H.-M., Huang, C.-C. and Yang, Y.-S. 2012. The association between microenvironmental reactive oxygen species and embryo development in assisted reproduction technology cycles. *Reprod Sci*, **19**: 725–732.
- Lemmens, L., Kos, S., Beijer, C., Braat, D.D.M., Nelen, W.L.D.M. and Wetzels, A.M.M. 2017. Techniques used for IUI: is it time for a change? *Hum Reprod*, **32**: 1835–1845.
- Li, X., Yang, Z.-S., Cai, W.-W., Deng, Y., Chen, L. and Tan, S.-L. 2021. Dihydropyridinyl Inhibits Tumor Growth and Epithelial-Mesenchymal Transition through regulating miR-455-3p in Cholangiocarcinoma. *J Cancer*, **12**: 6058–6070.
- Li, Y.-J., Ping, C., Tang, J. and Zhang, W. 2016. MicroRNA-455 suppresses non-small cell lung cancer through targeting ZEB1. *Cell Biol Int*, **40**: 621–628.
- Liang, J., Wang, S. and Wang, Z. 2017. Role of microRNAs in embryo implantation. *Reprod Biol Endocrinol*, **15**: 90.
- Ma, Z.-L., Wang, G., Lu, W.-H., Cheng, X., Chuai, M., Lee, K.K.H. and Yang, X. 2016. Investigating the effect of excess caffeine exposure on placental angiogenesis using chicken “functional” placental blood vessel network. *J Appl Toxicol*, **36**: 285–295.
- Maheshwari, A., Hamilton, M. and Bhattacharya, S. 2016. Should we be promoting embryo transfer at blastocyst stage? *Reprod Biomed Online*, **32**: 142–146.
- Makrigiannakis, A., Vrekoussis, T., Zoumakis, E., Kalantaridou, S.N. and Jeschke, U. 2017. The Role of HCG in Implantation: A Mini-Review of Molecular and Clinical Evidence. *Int J Mol Sci*, **18**: E1305.

- Martins, W.P., Nastri, C.O., Rienzi, L., van der Poel, S.Z., Gracia, C. and Racowsky, C. 2017. Blastocyst vs cleavage-stage embryo transfer: systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes. *Ultrasound Obstet Gynecol*, **49**: 583–591.
- Mascarenhas, M.N., Flaxman, S.R., Boerma, T., Vanderpoel, S. and Stevens, G.A. 2012. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*, **9**: e1001356.
- Mirkin, S., Arslan, M., Churikov, D., Corica, A., Diaz, J.I., Williams, S., Bocca, S. and Oehninger, S. 2005. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum. Reprod.*, **20**: 2104–2117.
- Missmer, S.A., Hankinson, S.E., Spiegelman, D., Barbieri, R.L., Marshall, L.M. and Hunter, D.J. 2004. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *Am J Epidemiol*, **160**: 784–796.
- Morin, S.J. 2017. Oxygen tension in embryo culture: does a shift to 2% O<sub>2</sub> in extended culture represent the most physiologic system? *J Assist Reprod Genet*, **34**: 309–314.
- Mumusoglu, S., Polat, M., Ozbek, I.Y., Bozdag, G., Papanikolaou, E.G., Esteves, S.C., Humaidan, P. and Yarali, H. 2021. Preparation of the Endometrium for Frozen Embryo Transfer: A Systematic Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **12**: 688237.
- Mutlu, M.F., Erdem, M., Erdem, A., Yildiz, S., Mutlu, I., Arisoy, O. and Oktem, M. 2013. Antral follicle count determines poor ovarian response better than anti-Müllerian hormone but age is the only predictor for live birth in in vitro fertilization cycles. *J Assist Reprod Genet*, **30**: 657–665.
- Nagy, Z.P., Shapiro, D. and Chang, C.-C. 2020. Vitrification of the human embryo: a more efficient and safer in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril*, **113**: 241–247.
- Nakagawa, K., Shirai, A., Nishi, Y., Sugiyama, Rie, Kuribayashi, Y., Sugiyama, Rikikazu and Inoue, M. 2010. A study of the effect of an extremely low oxygen concentration on the development of human embryos in assisted reproductive technology. *Reprod Med Biol*, **9**: 163–168.
- Nassar, F.J., El Sabban, M., Zgheib, N.K., Tfayli, A., Boulos, F., Jabbour, M., El Saghir, N.S., Talhouk, R., Bazarbachi, A., Calin, G.A. and Nasr, R. 2014. miRNA as potential biomarkers of breast cancer in the Lebanese population and in young women: a pilot study. *PLoS One*, **9**: e107566.
- Nastri, C.O., Nóbrega, B.N., Teixeira, D.M., Amorim, J., Diniz, L.M.M., Barbosa, M.W.P., Giorgi, V.S.I., Pileggi, V.N. and Martins, W.P. 2016. Low versus atmospheric oxygen tension for embryo culture in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, **106**: 95-104.e17.
- Ng, K.Y.B. and Cheong, Y. 2019. Hydrosalpinx - Salpingostomy, salpingectomy or tubal occlusion. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **59**: 41–47.
- Ng, K.Y.B., Mingels, R., Morgan, H., Macklon, N. and Cheong, Y. 2018. In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review. *Hum Reprod Update*, **24**: 15–34.
- Nie, L., Zhao, Y.-B., Zhao, D., Long, Y., Lei, Y., Liu, M., Wang, Y.-C., Zhang, X.-Q., Zhang, J.-H., Yuan, D.-Z. and Yue, L.-M. 2019. Progesterone-induced miR-152 interferes with embryonic



- implantation by downregulating GLUT3 in endometrial epithelium. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **316**: E557–E567.
- Ovarian Stimulation, T.E.G.G.O., Bosch, E., Broer, S., Griesinger, G., Grynberg, M., Humaidan, P., Kolibianakis, E., Kunicki, M., La Marca, A., Lainas, G., Le Clef, N., Massin, N., Mastenbroek, S., Polyzos, N., Sunkara, S.K., Timeva, T., Töyli, M., Urbancsek, J., Vermeulen, N., *et al.* 2020. ESHRE guideline: ovarian stimulation for IVF/ICSI†. *Hum Reprod Open*, **2020**: hoaa009.
- Owusu-Akyaw, A., Krishnamoorthy, K., Goldsmith, L.T. and Morelli, S.S. 2019. The role of mesenchymal-epithelial transition in endometrial function. *Hum Reprod Update*, **25**: 114–133.
- Papanikolaou, E.G., Timotheou, E., Tatsi, P., Janssens, H., Grynberg, M., Athanasiadis, A., Zafeirati, C., Najdecki, R. and Petousis, S. 2019. COMFFETI, Combined Fresh and Frozen Embryo Transfers per Individual: A New Index of Quality Control for The Performance of embryologic Labs in The Emerging Era of Segmentation of Cycle and Freeze-All Strategy. *Int J Fertil Steril*, **12**: 339–342.
- Paul, A.B.M., Sadek, S.T. and Mahesan, A.M. 2019. The role of microRNAs in human embryo implantation: a review. *J Assist Reprod Genet*, **36**: 179–187.
- Pinborg, A., Gaarslev, C., Hougaard, C.O., Nyboe Andersen, A., Andersen, P.K., Boivin, J. and Schmidt, L. 2011. Influence of female bodyweight on IVF outcome: a longitudinal multicentre cohort study of 487 infertile couples. *Reprod Biomed Online*, **23**: 490–499.
- Plotnikova, O., Baranova, A. and Skoblov, M. 2019. Comprehensive Analysis of Human microRNA-mRNA Interactome. *Front Genet*, **10**: 933.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. 2015a. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril*, **103**: e44-50.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. 2015b. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril*, **103**: e18-25.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address: [asrm@asrm.org](mailto:asrm@asrm.org) and Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. 2020. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril*, **114**: 1151–1157.
- Prior, J.C., Naess, M., Langhammer, A. and Forsmo, S. 2015. Ovulation Prevalence in Women with Spontaneous Normal-Length Menstrual Cycles - A Population-Based Cohort from HUNT3, Norway. *PLoS One*, **10**: e0134473.
- Raja, R., Kale, S., Thorat, D., Soundararajan, G., Lohite, K., Mane, A., Karnik, S. and Kundu, G.C. 2014. Hypoxia-driven osteopontin contributes to breast tumor growth through modulation of HIF1 $\alpha$ -mediated VEGF-dependent angiogenesis. *Oncogene*, **33**: 2053–2064.
- Rekker, K., Altmäe, S., Suhorutshenko, M., Peters, M., Martinez-Blanch, J.F., Codoñer, F.M., Vilella, F., Simón, C., Salumets, A. and Velthut-Meikas, A. 2018. A Two-Cohort RNA-seq Study Reveals Changes in Endometrial and Blood miRNome in Fertile and Infertile Women. *Genes (Basel)*, **9**.
- Rekker, K., Saare, M., Roost, A.M., Salumets, A. and Peters, M. 2013. Circulating microRNA Profile throughout the menstrual cycle. *PLoS ONE*, **8**: e81166.

- Revel, A., Achache, H., Stevens, J., Smith, Y. and Reich, R. 2011. MicroRNAs are associated with human embryo implantation defects. *Hum. Reprod.*, **26**: 2830–2840.
- Riesewijk, A., Martín, J., van Os, R., Horcajadas, J.A., Polman, J., Pellicer, A., Mosselman, S. and Simón, C. 2003. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol. Hum. Reprod.*, **9**: 253–264.
- Ruiz-Alonso, M., Blesa, D., Díaz-Gimeno, P., Gómez, E., Fernández-Sánchez, M., Carranza, F., Carrera, J., Vilella, F., Pellicer, A. and Simón, C. 2013. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil. Steril.*, **100**: 818–824.
- Ruiz-Alonso, M., Blesa, D. and Simón, C. 2012. The genomics of the human endometrium. *Biochim Biophys Acta*, **1822**: 1931–1942.
- Rumbold, A.R., Sevoyan, A., Oswald, T.K., Fernandez, R.C., Davies, M.J. and Moore, V.M. 2019. Impact of male factor infertility on offspring health and development. *Fertil Steril*, **111**: 1047–1053.
- Sahmay, S., Demirayak, G., Guralp, O., Ocal, P., Senturk, L.M., Oral, E. and Irez, T. 2012. Serum anti-müllerian hormone, follicle stimulating hormone and antral follicle count measurement cannot predict pregnancy rates in IVF/ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet*, **29**: 589–595.
- Salas-Huetos, A., Bulló, M. and Salas-Salvadó, J. 2017. Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: a systematic review of observational studies. *Hum Reprod Update*, **23**: 371–389.
- Santi, D., Crépieux, P., Reiter, E., Spaggiari, G., Brigante, G., Casarini, L., Rochira, V. and Simoni, M. 2020. Follicle-stimulating Hormone (FSH) Action on Spermatogenesis: A Focus on Physiological and Therapeutic Roles. *J Clin Med*, **9**.
- Sauer, M.V. 2015. Reproduction at an advanced maternal age and maternal health. *Fertil Steril*, **103**: 1136–1143.
- Sazonova, A., Källen, K., Thurin-Kjellberg, A., Wennerholm, U.-B. and Bergh, C. 2013. Neonatal and maternal outcomes comparing women undergoing two in vitro fertilization (IVF) singleton pregnancies and women undergoing one IVF twin pregnancy. *Fertil Steril*, **99**: 731–737.
- Schoolcraft, W.B., Gardner, D.K., Lane, M., Schlenker, T., Hamilton, F. and Meldrum, D.R. 1999. Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Fertil Steril*, **72**: 604–609.
- Semenza, G.L. 2000. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol*, **59**: 47–53.
- Seshagiri, P.B., Vani, V. and Madhulika, P. 2016. Cytokines and Blastocyst Hatching. *Am J Reprod Immunol*, **75**: 208–217.
- Sha, A.-G., Liu, J.-L., Jiang, X.-M., Ren, J.-Z., Ma, C.-H., Lei, W., Su, R.-W. and Yang, Z.-M. 2011. Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing. *Fertil. Steril.*, **96**: 150-155.e5.
- Sheridan, M.A., Fernando, R.C., Gardner, L., Hollinshead, M.S., Burton, G.J., Moffett, A. and Turco, M.Y. 2020. Establishment and differentiation of long-term trophoblast organoid cultures from the human placenta. *Nat Protoc*, **15**: 3441–3463.

- Shi, C., Shen, H., Fan, L.-J., Guan, J., Zheng, X.-B., Chen, X., Liang, R., Zhang, X.-W., Cui, Q.-H., Sun, K.-K., Zhao, Z.-R. and Han, H.-J. 2017. Endometrial MicroRNA Signature during the Window of Implantation Changed in Patients with Repeated Implantation Failure. *Chin. Med. J.*, **130**: 566–573.
- Smith-Vikos, T. and Slack, F.J. 2012. MicroRNAs and their roles in aging. *J Cell Sci*, **125**: 7–17.
- Stewart, E.A., Laughlin-Tommaso, S.K., Catherino, W.H., Lalitkumar, S., Gupta, D. and Vollenhoven, B. 2016. Uterine fibroids. *Nat Rev Dis Primers*, **2**: 16043.
- Storr, A., Bilir, E., Cooke, S., Garrett, D. and Venetis, C.A. 2019. Fine-tuning blastocyst selection based on morphology: a multicentre analysis of 2461 single blastocyst transfers. *Reprod Biomed Online*, **39**: 588–598.
- Su, M.-T., Tsai, P.-Y., Tsai, H.-L., Chen, Y.-C. and Kuo, P.-L. 2017. miR-346 and miR-582-3p-regulated EG-VEGF expression and trophoblast invasion via matrix metalloproteinases 2 and 9. *Biofactors*, **43**: 210–219.
- Sun, H., Gong, T.-T., Jiang, Y.-T., Zhang, S., Zhao, Y.-H. and Wu, Q.-J. 2019. Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990–2017: results from a global burden of disease study, 2017. *Aging (Albany NY)*, **11**: 10952–10991.
- Swain, J.E. 2012. Is there an optimal pH for culture media used in clinical IVF? *Hum Reprod Update*, **18**: 333–339.
- Tal, R. and Seifer, D.B. 2017. Ovarian reserve testing: a user’s guide. *Am J Obstet Gynecol*, **217**: 129–140.
- Talbi, S., Hamilton, A.E., Vo, K.C., Tulac, S., Overgaard, M.T., Dosiou, C., Le Shay, N., Nezhat, C.N., Kempson, R., Lessey, B.A., Nayak, N.R. and Giudice, L.C. 2006. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology*, **147**: 1097–1121.
- Timón-Gómez, A., Bartley-Dier, E.L., Fontanesi, F. and Barrientos, A. 2020. HIGD-Driven Regulation of Cytochrome c Oxidase Biogenesis and Function. *Cells*, **9**: E2620.
- Trounce, I. 2000. Genetic control of oxidative phosphorylation and experimental models of defects. *Hum Reprod*, **15 Suppl 2**: 18–27.
- Turchinovich, A., Samatov, T.R., Tonevitsky, A.G. and Burwinkel, B. 2013. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet*, **4**: 119.
- Turco, M.Y., Gardner, L., Kay, R.G., Hamilton, R.S., Prater, M., Hollinshead, M.S., McWhinnie, A., Esposito, L., Fernando, R., Skelton, H., Reimann, F., Gribble, F.M., Sharkey, A., Marsh, S.G.E., O’Rahilly, S., Hemberger, M., Burton, G.J. and Moffett, A. 2018. Trophoblast organoids as a model for maternal-fetal interactions during human placentation. *Nature*, **564**: 263–267.
- Umarsingh, S., Adam, J.K. and Krishna, S.B.N. 2020. The relationship between anti-Müllerian hormone (AMH) levels and pregnancy outcomes in patients undergoing assisted reproductive techniques (ART). *PeerJ*, **8**: e10390.
- Van den Abbeel, E., Balaban, B., Ziebe, S., Lundin, K., Cuesta, M.J.G., Klein, B.M., Helmgard, L. and Arce, J.-C. 2013. Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer. *Reprod Biomed Online*, **27**: 353–361.

- Van der Hauwaert, C., Savary, G., Hennino, M.-F., Pottier, N., Glowacki, F. and Cauffiez, C. 2015. [MicroRNAs in kidney fibrosis]. *Nephrol Ther*, **11**: 474–482.
- Verze, P., Cai, T. and Lorenzetti, S. 2016. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat Rev Urol*, **13**: 379–386.
- Wale, P.L. and Gardner, D.K. 2016. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod Update*, **22**: 2–22.
- Wang, B., Zou, A., Ma, L., Chen, X., Wang, L., Zeng, X. and Tan, T. 2017. miR-455 inhibits breast cancer cell proliferation through targeting CDK14. *Eur J Pharmacol*, **807**: 138–143.
- Wang, F., Qualls, A.E., Marques-Fernandez, L. and Colucci, F. 2021. Biology and pathology of the uterine microenvironment and its natural killer cells. *Cell Mol Immunol*, **18**: 2101–2113.
- Wang, R., Danhof, N.A., Tjon-Kon-Fat, R.I., Eijkemans, M.J., Bossuyt, P.M., Mochtar, M.H., Veen, F. van der, Bhattacharya, S., Mol, B.W.J. and Wely, M. van. 2019. Interventions for unexplained infertility: a systematic review and network meta-analysis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, doi: 10.1002/14651858.CD012692.pub2.
- Xu, H., Zhou, M., Cao, Y., Zhang, D., Han, M., Gao, X., Xu, B. and Zhang, A. 2019. Genome-wide analysis of long noncoding RNAs, microRNAs, and mRNAs forming a competing endogenous RNA network in repeated implantation failure. *Gene*, **720**: 144056.
- Yang, Q., Gu, W.-W., Gu, Y., Yan, N.-N., Mao, Y.-Y., Zhen, X.-X., Wang, J.-M., Yang, J., Shi, H.-J., Zhang, X. and Wang, J. 2018. Association of the peripheral blood levels of circulating microRNAs with both recurrent miscarriage and the outcomes of embryo transfer in an in vitro fertilization process. *J Transl Med*, **16**: 186.
- Yang, Y., Xu, Y., Ding, C., Khoudja, R.Y., Lin, M., Awonuga, A.O., Dai, J., Puscheck, E.E., Rappolee, D.A. and Zhou, C. 2016. Comparison of 2, 5, and 20 % O<sub>2</sub> on the development of post-thaw human embryos. *J Assist Reprod Genet*, **33**: 919–927.
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., van der Poel, S., International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology, and World Health Organization. 2009. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod*, **24**: 2683–2687.
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I.D., Simpson, J.L. and van der Poel, S. 2017. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Hum Reprod*, **32**: 1786–1801.
- Zhang, S., Lin, H., Kong, S., Wang, S., Wang, Hongmei, Wang, Haibin and Armant, D.R. 2013. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med*, **34**: 939–980.
- Zhao, X.-S., Han, B., Zhao, J.-X., Tao, N. and Dong, C.-Y. 2019. MiR-155-5p affects Wilms' tumor cell proliferation and apoptosis via targeting CREB1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **23**: 1030–1037.

Zorova, L.D., Popkov, V.A., Plotnikov, E.Y., Silachev, D.N., Pevzner, I.B., Jankauskas, S.S., Babenko, V.A., Zorov, S.D., Balakireva, A.V., Juhaszova, M., Sollott, S.J. and Zorov, D.B. 2018. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem*, **552**: 50–59.



## Annexe 1 :

### Etude de faisabilité sur une cohorte embryonnaire indépendante

**Introduction :** L'analyse du transcriptome d'embryons humains sur puce a permis de mettre en évidence la régulation de 707 gènes entre les embryons cultivés en stratégie monophasique (5% d'oxygène de J0 à J5/6) et ceux cultivés en stratégie séquentielle (5% de J0 à J3 puis à 2% d'O<sub>2</sub> jusqu'à J5/6).

Parmi ces 707 gènes, nous avons sélectionné 5 mRNA : hypoxia inducible lipid droplet-associated (HILPDA, FC = 2.21, p-value = 0.0131), neogenin 1 (NEO1, FC = -3.7, p-value = 0.0116), serine/threonine kinase 3 (STK3, FC = 3.41, p-value = 0.0028), Dmx-like 2 (DMXL2, FC = 3.6, p-value =  $2.9 \cdot 10^{-5}$ ) et HIG1 hypoxia inducible domain family, member 2A (HIGD2A, FC = 2.92, p-value = 0.0067).

L'objectif est d'évaluer l'expression de ces miRNA par RT-qPCR (transcription inverse-réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel ou reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction) dans une cohorte indépendante d'embryons humaines donnés à la recherche selon la stratégie de culture utilisée.

## **Matériel et méthode :**

### **1) Ethique, design de l'étude, procédure de FIV**

L'agence de la biomédecine a autorisé l'utilisation d'embryons humains de FIV donnés à la recherche pour l'étude *in vitro* (NOR : SSAB1816140S). Tous les patients ont signé un consentement informé pour le don de leur embryons cryopréservés et pour la collection de leurs données cliniques et biologiques.

Cette étude rétrospective a été menée dans le département de médecine reproductive de l'hôpital universitaire de Montpellier entre 2011 et 2019. Au total, 27 couples ont été inclus pour l'évaluation par RT-qPCR de l'expression des 5 gènes sélectionnés, dont 17 couples ont donné des embryons cultivés en stratégie monophasique et 10 couples ont donné des embryons cultivés en stratégie séquentielle. Chaque groupe était constitué de 2 pool de 11 embryons représentant 44 blastocystes au total, dont 37 ont été obtenus par ICSI et 7 par FIVc. Les patientes étaient sous cycle d'hyperstimulations ovariennes contrôlées.

Pour la procédure de FIV précise, se référer à la partie « Material and methods » « IVF procedures » de l'article Brouillet *et al.* (pages 86 à 88).

### **2) Evaluation des blastocystes, congélation et décongélation**

Les blastocystes ont été évalués à J5/6 selon le système de classification de Gardner & Schoolcraft (Schoolcraft *et al.*, 1999). Les blastocystes utiles, définis comme en voie d'expansion (stade 3), expansé (stade 4), en voie d'éclosion (stade 5) ou éclos (stade 6) avec un trophectoderme de qualité B minimale, ont été cryopréservés. Tous les embryons ont été cryopréservés par vitrification et décongelés en suivant les recommandations du fabricant (vit kit-freeze et vit kit-Thaw, FUJIFILM Irvine Scientific – Biocare Europe<sup>TM</sup>). Les 44 embryons de notre étude ont été décongelés par la même personne entre le 20 et le 23 juillet 2021 et correspondent aux critères précédemment définis pour les blastocystes utiles. Une fois décongelés, les embryons ont été placés à -80°C pour les futures analyses.

### **3) Extraction des ARN totaux et RT-qPCR**

Les 11 embryons de chaque pool ont été réunis préalablement à l'extraction et les ARN totaux ont été extraits et purifiés en suivant les recommandations du RNeasy Micro Kit Qiagen (Cat#74004, Qiagen, Courtaboeuf, France). Les ARN ont été élués dans 10µl finaux de RNase-free water et stockés à -80°C. Pour la RT, 8µl d'ARN total de chaque pool a été utilisé et la procédure a été réalisée selon les recommandations du fabricant (Applied Biosystems,

Villebonsur Yvette, France) comme décrit précédemment (Bissonnette *et al.*, 2016). Pour la qPCR, 2µl d'ADN simple brin ont été ajoutés dans 10µl de mix réactionnels contenant 0.25 µM de chaque primer et 5µl de 2X LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche, Mannheim, Germany). L'ADN a été amplifié pour 45 cycles avec une température de 63°C en utilisant le système de détection du Light Cycle 480 (Roche). L'expression des gènes d'intérêt a été normalisée par l'expression du gène de ménage GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) en utilisant la formule du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  :

$$2^{-((Cp2\%_{\text{gène d'intérêt}} - Cp2\%_{\text{GAPDH}}) - (Cp5\%_{\text{gène d'intérêt}} - Cp5\%_{\text{GAPDH}}))}$$

(2, correspondant à l'efficacité de la réaction de PCR)

Chaque pool a été analysé en triplicat, et plusieurs contrôle négatifs contenant de l'eau ont été inclus. Cette méthode permet une quantification relative des résultats. On considèrera un résultat comme significatif s'il est supérieur à 2 ou inférieur à 0.5, c'est-à-dire que l'expression du gène dans le groupe d'intérêt (2%) sera 2 fois supérieure ou 2 fois inférieure à l'expression dans le groupe contrôle (5%).

## Résultats :

Les données clinicobiologiques associées aux patients étaient similaires entre les 2 pools de chaque groupe et entre les 2 groupes (âges maternels et paternels à la ponction, BMI maternel, tabagisme maternel et paternel, AMH, CFA, durée de la stimulation et doses hormonales reçues). Excepté pour la moyenne d'AMH qui était significativement supérieure dans le groupe 5% par rapport au groupe 2% (4.24 vs 1.8, p-value = 0.003) et pour la dose totale de FSH reçue pendant la stimulation des patientes qui était en moyenne supérieure dans le groupe 2% (2281 vs 1773 UI, p-value = 0.006). Enfin, de façon cohérente avec notre étude clinique, le nombre d'enfants nés vivants était supérieur dans le groupe 2% (21 vs 17, p-value = 0.005).

$2^{-\Delta\Delta Ct}$  HILPDA = 1.16 ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  NEO1 = 1.12 ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  STK3 = 1.6 ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  DMXL2 = 1.26 ;  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  HIGD2A = 1.03

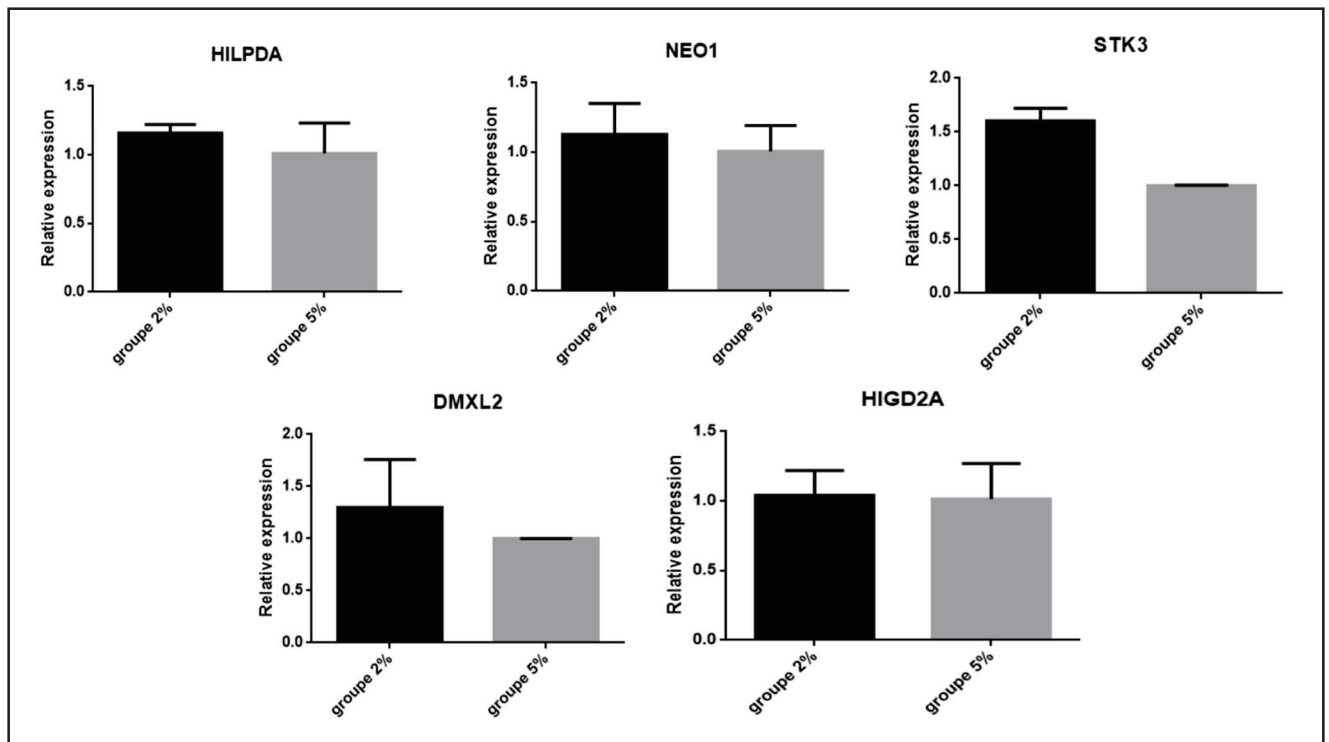


Figure 21 Quantification relative par la formule  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  de 5 mRNA par RT-qPCR. Groupe 2% (blastocystes cultivés en stratégie séquentielle), n=2 pool de 11 embryons. Groupe 5% (blastocystes cultivés en stratégie monophasique), n=2 pool de 11 embryons.

Conclusion : Aucun gène n'a été significativement validé cependant, nous observons une tendance du gène STK3 à être surexprimé dans le groupe 2% par rapport au groupe 5%.

## ABSTRACT

The transfer of a competent embryo into a uterine cavity during the implantation window is a major objective to ensure success in in vitro fertilization (IVF). My thesis work contributes to (i) the identification of new biomarkers for the evaluation of endometrial receptivity (ii) the understanding of embryo competence in IVF.

Concerning the first axis, the team has developed the Win-Test®, an endometrial receptivity evaluation test based on the search for a specific transcriptomic signature in endometrial biopsies taken from patients during their theoretical implantation window. The purpose of this test is to determine the appropriate time to replace the embryo. When the “receptive” period is identified, it allows the embryo transfer date to be adapted to the patient’s effective window of implantation, significantly increasing the pregnancy rate after personalized frozen embryo(s) transfer (Haouzi et al, 2020). To date, this test requires two endometrial biopsies and can only be performed on a frozen/thawed embryo transfer. In order to overcome these two constraints, the objective of my thesis was to participate in the development of a non-invasive approach in the evaluation of endometrial receptivity in IVF. Analysis of microRNA expression profiles from endometrial biopsies allowed us to identify certain endometrial microRNAs associated with endometrial receptivity ("receptive" versus "non-receptive") as well as with the success of the attempt ("implantation failure" versus "successful implantation" and "miscarriage" versus "birth") (Drissenek, Baron, et al, 2020). My preliminary results indicate that some of these microRNAs are detected in the serum of patients, thus opening interesting perspectives for the development of a specific non-invasive test of endometrial receptivity.

The second axis of my thesis focused on the improvement of the development and the early implant potential of human embryos. In vivo, the embryo evolves in the fallopian tube until the morula stage and arrives in the uterus at the blastocyst stage around D6 post fertilization, in an endometrium supposed to be receptive which will be able to ensure implantation. Physiologically, it has been shown that the oxygen level is 5% in the fallopian tubes and 2% in the uterus. To date, the majority of IVF laboratories in the world use 5% oxygen from D0 to D6 for the in vitro culture of human embryos. Our results showed that biphasic in vitro culture at 5% oxygen from D0 to D3 and then at 2% oxygen from D3 to D5/D6 (thus mimicking physiological oxygen concentrations) significantly improves human embryo development and live birth rates in IVF. Using a transcriptomic approach, our results highlighted the different expression of 707 genes depending on whether the embryos were cultured at 5% oxygen or at 5% and then 2% oxygen, with an overexpression of the majority (93.8%) of dysregulated transcripts in embryos cultured with biphasic strategy (5-2% oxygen). Functional analysis revealed the involvement of these RNAs in key cellular processes of embryonic growth and implant potential; such as proliferation, DNA repair and maintenance of pluripotency. These results open new perspectives for the improvement of embryonic culture conditions, subject to confirmation in a larger scale study.



## RÉSUMÉ

Le transfert d'un embryon compétent dans la cavité utérine pendant la fenêtre d'implantation est un objectif majeur pour garantir le succès en Fécondation in vitro (FIV). Mon travail de thèse contribue (i) à l'identification de nouveaux biomarqueurs d'évaluation de la réceptivité endométriale (ii) à la compréhension de la compétence embryonnaire en FIV.

Concernant le premier axe, l'équipe a mis au point le Win-Test®, test d'évaluation de la réceptivité endométriale basé sur la recherche d'une signature transcriptomique spécifique au sein de biopsies endométriales prélevées chez des patientes pendant leur fenêtre théorique d'implantation. Le but de ce test est de déterminer le moment adéquat pour replacer l'embryon. Lorsque la période « réceptive » est identifiée, il permet d'adapter la date du transfert embryonnaire à la fenêtre implantatoire effective de la patiente, augmentant significativement le taux de grossesses après transfert personnalisé d'embryon(s) congelé(s) (Haouzi et al, 2020). A ce jour, ce test nécessite la réalisation de deux biopsies endométriales, et ne peut être réalisé que sur un transfert d'embryon congelé/décongelé. Pour tenter de s'affranchir de ces deux contraintes, l'objectif de ma thèse a été de participer à la mise au point d'une approche non-invasive de l'évaluation de la réceptivité endométriale en FIV. L'analyse des profils d'expression des microARNs issus de biopsies endométriales nous a permis d'identifier certains microARNs endométriaux associés à la réceptivité endométriale (« réceptif » versus « non réceptif ») ainsi qu'au succès de la tentative (« échec d'implantation » versus « implantation réussie ») et « fausse couche » versus « naissance ») (Drissenek, Baron, et al, 2020). Mes résultats préliminaires indiquent que certains de ces microARNs sont détectés dans le sérum des patientes, ouvrant ainsi des perspectives intéressantes pour la mise au point d'un test non-invasif spécifique de la réceptivité endométriale.

Le second axe de ma thèse a porté sur l'amélioration du développement et du potentiel implantatoire précoce des embryons humains. En effet, l'embryon évolue in vivo dans la trompe de Fallope jusqu'au stade morula et arrive dans l'utérus au stade de blastocyste vers J6 post-fécondation, dans un endomètre supposé réceptif qui pourra assurer l'implantation. Physiologiquement, il a été montré que le taux d'oxygène était de 5% dans les trompes de Fallope, puis de 2% dans l'utérus. A ce jour, la majorité des laboratoires de FIV dans le monde utilise pourtant 5% d'oxygène de J0 à J6 pour la culture in vitro des embryons humains. Nos résultats ont montré qu'une culture in vitro séquentielle à 5% d'oxygène de J0 à J3 puis à 2% d'oxygène de J3 à J5/J6 (mimant ainsi les concentrations physiologiques en oxygène) améliorerait significativement le développement embryonnaire humain et les taux de naissances vivantes en FIV. En utilisant une approche transcriptomique, nos résultats mettent en évidence la différenciation d'expression de 707 gènes selon que les embryons aient été cultivés à 5% d'oxygène ou à 5% puis 2% d'oxygène, avec une surexpression de la majorité (93,8%) des transcrits dérégulés dans les embryons cultivés en stratégie séquentielle (5-2% d'oxygène). L'analyse fonctionnelle a mis en évidence l'implication de ces ARNs dans des processus cellulaires clés de la croissance et du potentiel implantatoire embryonnaire ; tels que la prolifération, la réparation de l'ADN et le maintien de la pluripotence. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'amélioration des conditions de culture embryonnaire sous réserve de la confirmation sur une étude à plus large échelle.