



**HAL**  
open science

# L'ADN libre intra-folliculaire : biomarqueur non invasif de la qualité embryonnaire chez les patientes avec syndrome des ovaires polykystiques

Alice Fournier

## ► To cite this version:

Alice Fournier. L'ADN libre intra-folliculaire : biomarqueur non invasif de la qualité embryonnaire chez les patientes avec syndrome des ovaires polykystiques. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01621749

**HAL Id: dumas-01621749**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01621749v1>**

Submitted on 23 Oct 2017

**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.

MÉMOIRE  
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES  
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 19 octobre 2017

Par

**Mlle Alice FOURNIER**  
Née le 13 février 1991

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76  
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE

----oOo----

**L'ADN LIBRE INTRA-FOLLICULAIRE : BIOMARQUEUR NON  
INVASIF DE LA QUALITE EMBRYONNAIRE CHEZ LES PATIENTES  
AVEC SYNDROME DES OVAIRES POLYKYSTIQUES**

----oOo----

**JURY :**

Président : Madame le Professeur Florence SABATIER  
Membres : Madame le Professeur Catherine GUILLEMAIN  
Monsieur le Professeur Samir HAMAMAH  
Madame le Docteur Alice FERRIERES-HOA  
Madame le Docteur Jeanne PERRIN

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05  
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

**ADMINISTRATION :**

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. Philippe CHARPIOT, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	M. David BERGE-LEFRANC, M. François DEVRED, Mme Caroline DUCROS, Mme Pascale BARBIER
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Jean-Pierre REYNIER
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Jacques BARBE, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI,
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Sandrine NOURIAN
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Myriam TORRE

**DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

**PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI  
Mme Odile RIMET-GASPARINI  
Mme Pascale BARBIER  
M. François DEVRED  
Mme Manon CARRE  
M. Gilles BREUZARD  
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA  
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE  
M. Emmanuel CAUTURE  
Mme Véronique ANDRIEU  
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

## A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

## ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Caroline MONTET

## DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

## PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE  
Mme Laurence CAMOIN  
Mme Florence SABATIER-MALATERRE

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN  
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET  
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Nathalie BARDIN Mme Dominique ARNOUX Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

## A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Sylvie COINTE
----------------------------	-------------------

## DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

## PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Henri PORTUGAL Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

**PROFESSEURS ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (P.A.S.T.)**GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE  
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE

M. Jean-Pierre CALISSI

**MAITRES DE CONFERENCES**

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL  
Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Elisabeth SCHREIBER-DETURMENY  
Mme Catherine DEFOORT  
M. Alain NICOLAY  
Mme Estelle WOLFF  
Mme Elise LOMBARDCHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET  
NUISANCES TECHNOLOGIQUESM. David BERGE-LEFRANC  
M. Pierre REBOUILLON

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Catherine DIANA  
Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT  
Mme Caroline DUCROS  
M. Marc MONTANACHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE  
HYDROLOGIEM. Armand GELLIS  
M. Christophe CURTI  
Mme Julie BROGGI  
M. Nicolas PRIMAS  
M. Cédric SPITZ  
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

M. Riad ELIAS  
Mme Valérie MAHIOU-LEDDER  
Mme Sok Siya BUN  
Mme Béatrice BAGHDIKIAN**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET  
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Thierry ATHUYT

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE

M. Marc LAMBERT

DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE  
ET GESTION DE LA PHARMAFAC

M. Philippe BESSON

**AHU**

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

Mme Manon ROCHE

**ATER**

CHIMIE ANALYTIQUE

Mme Camille DESGROUAS

**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

**PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Athanassios ILIADIS
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

**MAITRES DE CONFERENCES**

PHARMACODYNAMIE	Mme Suzanne MOUTERDE-MONJANEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Hot BUN M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD M. Stéphane HONORÉ Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

**A.H.U.**

PHARMACODYNAMIE	M. Philippe GARRIGUE
-----------------	----------------------

**ATER**

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlel BOUHLEL
-----------------	---

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Nathalie AUSIAS, Pharmacien-Praticien hospitalier  
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier  
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier  
M. Gérard CARLES, Pharmacien-Praticien hospitalier  
Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier  
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier  
Mme Christine PENOT-RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier  
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire  
M. Alain RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier  
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

Mise à jour le 1<sup>er</sup> décembre 2015

*L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.*

## REMERCIEMENTS

**A Madame le Professeur Florence Sabatier**, je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury et d'avoir accepté de juger ce travail.

**A Monsieur le Professeur Samir Hamamah**, je vous adresse mes remerciements pour m'avoir permis de découvrir cette spécialité qui me tient tant à cœur et m'avoir accueillie dans votre service au cours de deux semestres riches en apprentissage professionnel et personnel. Je vous témoigne ici mon profond respect et ma reconnaissance, ainsi que ma gratitude pour me permettre de poursuivre cette aventure.

**A Madame le Professeur Catherine Guillemain**, merci beaucoup d'avoir accepté de juger ce travail, j'en suis honorée. Merci pour votre gentillesse et votre accueil au sein du service de la Conception, pour un semestre très enrichissant.

**A ma directrice de thèse Madame le Docteur Alice Ferrière-Hoa**, merci Alice pour ta gentillesse, ton sourire permanent et ta compréhension tout au long du semestre, pour la confiance que tu m'as accordée en acceptant d'encadrer ce travail, ainsi que pour tes conseils avisés et ton aide, en particulier dans la dernière ligne droite.

**A Madame le Docteur Jeanne Perrin**, merci à toi d'avoir accepté de participer à ce jury, ce fût un plaisir de te rencontrer et c'est une joie pour moi de te croiser à nouveau sur ce parcours professionnel.

A **Anna Gala**, parce que c'est un réel plaisir de travailler à tes côtés, pour ta bonne humeur et ton sourire, ta patience et ta grande disponibilité. Je suis ravie de pouvoir continuer à travailler avec toi.

A **Tiffany Mullet**, merci Tiffany pour ton aide très précieuse dans la réalisation de cette thèse, pour m'avoir permis de poursuivre humblement le travail que tu as si bien mené, et pour m'avoir montré l'exemple de la rigueur dans le travail. Je te souhaite beaucoup de bonheur à l'autre bout du monde.

Merci à **Charlène Innocenti** pour ton travail technique, ta réactivité et tes explications.

Merci à **Nelly Guigue** pour la réalisation des statistiques, pour ta rapidité, ta gentillesse et ta compréhension.

Merci à **Katarina, Céline, Agnès, Valérie et Séverine**, parce que c'est un immense plaisir de travailler tous les jours à vos côtés. Merci pour votre bonne humeur, pour cette super ambiance au quotidien, pour tout ce que vous m'avez appris et ce que vous m'apprendrez encore. Une pensée toute particulière au superkatazoïde à qui j'adresse tout mon soutien.

Merci à **Sabine**, parce que le labo ne serait pas le même sans toi. Merci pour ton humour, ta franchise et ton écoute dans les moments difficiles, et ta générosité.

Merci à **Stéphanie**, pour ta bonne humeur permanente, et ta capacité à trouver des solutions à tous les problèmes. A **Camille** pour ta douceur et ta bienveillance, et à **Chantal** pour ton sourire et ta gentillesse. Merci aussi à Philippe et Elodie.

Merci à mes co-internes, d'abord les co-thésards : **Eloïse** pour avoir partagé nos joies et nos pleurs (surtout nos pleurs) et **Amaël, Margaux**, et **Sophie** pour ce semestre riche en émotions. Merci pour votre aide, votre soutien et pour avoir gardé une belle ambiance.

**À mon papa**, parce que si j'en suis là c'est surtout grâce à toi. Merci pour ton amour et ton soutien sans faille, merci d'avoir toujours été là. Merci pour tes valeurs. Je t'aime.

**A ma maman**, même si tu n'es plus là pour voir tout ça, tu m'accompagnes chaque jour dans mes pensées et dans mes choix. Tu me manques.

**A mes frères, Alexandre et Benjamin**, je ne suis que la troisième à passer une thèse mais j'ai été à bonne école. Merci pour toutes ces années de bonheur, pour votre humour et votre optimisme. Merci pour tout.

**A mes grands-parents**, merci pour tous ces moments de bonheur partagés, pour votre présence et votre immense générosité.

**A tous les membres de la famille**, des deux familles, parce que vous avez contribué à tout ça et que c'est toujours un grand bonheur d'être ensemble.

**A Anaïs et Caroline**, mes deux super belles-sœurs, pour votre présence féminine et pour la joie de vous avoir dans la famille. Vivement le petit neveu.

A **Claire**, parce que je ne peux pas devenir Docteur en Pharmacie sans penser d'abord à toi. C'est avec toi que j'ai commencé l'aventure. Merci d'être mon amie, ma confidente, celle qui me ressemble et qui me comprend si bien. Je sais qu'on ne s'oublie pas.

A **tous ceux de la fac**, en particulier celles qui ont partagé les bancs de l'amphi et de nombreux fous-rires avec moi, **Cosette, Hélène, Claire**, et aussi à la promo pour ces très belles années. Merci aussi à ceux de la corpo c'était un grand plaisir de faire un peu partie de cette famille.

A **Clément, Martin, Laure, Antoine, Julie, Céline, Nico, Gaëlle, Anne-So, Laure, Aurélie, Chloé, François...** et aussi à **Fifi, Alexis et Romain** ; pour m'avoir si bien intégrée, pour toutes ces soirées et ces weekends partagés qui, je l'espère, seront encore nombreux.

Merci à **Béa**, pour ton humour, ton calme, pour tous ces fous-rires, et ces deux semestres partagés. Merci à **Caro** pour ta joie de vivre et ton grain de folie, j'ai bien commencé l'internat grâce à vous. Merci aussi à **Charlotte** pour tous ces moments mythiques. L'internat n'aurait pas été le même sans vous. Au final la bactério ça rapproche !

A **Lucie**, merci d'être toi, de prendre les choses à cœur, d'écouter. Tu es précieuse.

A **Arnaud**, pour tous ces bons moments et ces fous-rires ensemble, ils ont été nombreux. Merci d'être si décontracté.

A **Jix**, pour les trajets à l'hôpital Nord, les weekends à Grenoble, pour être aussi magique, et pour Tragédie.

A **Doriane**, pour ta joie de vivre et ta présence, pour motiver toujours plus.

A **Omar**, pour être aussi agréable en journée que fou en soirée, tu me fais rêver.

A **Anne-Camille**, pour ton humour et ta décontraction, et pour être un bon exemple à suivre. Merci à tous pour tous les bons souvenirs de ces quatre années, j'espère encore en créer beaucoup avec vous.

Merci à la **Team Hémato Conception, Ju, Thibault, Charlotte, Estelle, Anne-So**, pour le meilleur semestre de l'internat. On s'est quand même bien marrés.

A **Jean-Sé**, pour ta folie, ton investissement, mais aussi pour ton écoute et les nombreux partages de rires de câlins et de larmes.

A **Jo**, pour ton humour mais aussi ton sérieux, pour tous ces bons moments partagés en AG, et bien d'autres aussi.

A tous les autres internes que je ne peux pas citer mais avec qui j'ai pu discuter, apprendre, rire, et profiter.

Merci au **Bureau de la FNSIP-BM 2015-2016** pour cette année inoubliable. J'ai appris beaucoup à vos côtés et j'ai rencontré des personnes formidables. Plein de moments forts, de travail, et de soirées exceptionnelles.

Merci en particulier à **Julien**, mon binôme de choc, parce qu'on s'est vraiment éclatés et que je ne l'aurais pas fait sans toi. Merci aussi à **Eugénie**, ma super présidente-colocataire-amie, pour ta bonne humeur et ta motivation contagieuses. Ça a été un plaisir de partager tout ça avec toi.

Merci **aux colocs de la Rue Bobillot** pour leur porte toujours ouverte.

A **Evariste**, enfin, pour ces 8 années très riches en émotions, parce que tout ça est lié à toi, parce que tu as changé ma vie. La pharmacie, les études, l'internat, la fête, et tout le reste, rien n'aurait été pareil sans toi. Merci pour ta présence permanente, pour ton calme et ta patience, pour m'avoir supportée, pour avoir géré les crises, les angoisses, les fous-rires, les larmes, les joies et les peines, merci d'avoir toujours cru en moi. Merci aussi de m'avoir suivie à Marseille, pour le meilleur je l'espère. Merci pour toutes les merveilleuses rencontres que tu m'as fait faire, elles sont nombreuses. Merci pour tout ce que j'ai appris et découvert à tes côtés. On a quand même bien profité.

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	3
<b>INTRODUCTION</b> .....	4
<b>REVUE DE LA LITTERATURE</b> .....	7
<b>I. LE SYNDROME DES OVAIRES POLYKYSTIQUES</b> .....	8
1. Définition .....	8
2. Phénotypes du SOPK .....	11
3. Physiopathologie .....	12
4. Qualité ovocytaire et embryonnaire chez les patientes avec SOPK .....	13
<b>II. BIOMARQUEURS EN AMP</b> .....	21
1. Morphologie ovocytaire et embryonnaire .....	21
2. Développement de nouveaux biomarqueurs .....	22
3. Le liquide folliculaire .....	23
<b>III. ADN LIBRE</b> .....	25
1. Généralités .....	25
2. Place de l'ADN libre en santé humaine .....	26
3. L'ADN libre en reproduction humaine .....	28
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	30
1. Population étudiée .....	31
2. Déroulement de la stimulation ovarienne et de la ponction ovocytaire .....	31
3. Procédure de FIV conventionnelle ou FIV-ICSI .....	32
4. Obtention et préparation des échantillons de liquide folliculaire .....	35

5. Dosage de l'ADN libre dans les échantillons .....	35
6. Analyse statistique .....	38
<b>RESULTATS</b> .....	<b>39</b>
1. Caractéristiques de la population .....	40
2. Données cliniques .....	40
3. Paramètres de la stimulation .....	43
4. Résultats des tentatives : ovocytes et développement embryonnaire .....	45
5. Probabilité d'obtention d'une grossesse .....	47
6. Evaluation des différents paramètres selon le seuil d'ADN libre déterminé .....	48
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>50</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>58</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- AMH** : *Anti müllerian hormone*, Hormone anti-müllérienne
- AMP** : Assistance Médicale à la Procréation
- ARN** : Acide Ribonucléique
- CCO** : Complexe cumulo-ovocytaire
- CFA** : Compte des Follicules Antraux
- E2** : 17 $\beta$  œstradiol
- ET** : Ecart-type
- FIV** : Fécondation in vitro
- FIVc** : Fécondation in vitro conventionnelle
- FSH** : *Follicle Stimulating Hormone*, Hormone folliculo-stimulante
- GnRH** : *Gonadotropin Releasing Hormone*, Gonadolibérine
- GP** : Globule polaire
- hCG** : Hormone Chorionique Gonadotrophique
- hMG** : *Human menopausal gonadotropin*, Gonadotrophine humaine post-ménopausique
- HSO** : Hyperstimulation ovarienne
- ICSI** : *Intracytoplasmic sperm injection*, Fécondation in vitro avec micro-manipulation
- IMC** : Indice de Masse Corporelle
- IOP** : Insuffisance Ovarienne Pré maturée
- LF** : Liquide folliculaire
- LH** : *Luteinizing hormone*, Hormone lutéinisante
- MCI** : Masse Cellulaire Interne
- MII** : Métaphase II
- NIH** : National Institute of Health
- PN** : Pronucléus
- PCR** : *Polymerase Chain Reaction*, Réaction de polymérisation en chaîne
- PGS** : *Pre-implantation Genetic Screening*, Screening Génétique Pré-implantatoire
- qPCR** : PCR quantitative
- r-FSH** : FSH recombinante
- SOPK** : Syndrome des Ovaires Polykystiques
- TE** : Trophoctoderme
- ZP** : Zone pellucide

# **INTRODUCTION**

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) a été décrit pour la première fois en 1935 par Stein et Leventhal (1). Il s'agit de la plus fréquente cause d'infertilité liée à un trouble de l'ovulation, puisqu'il touche 5 à 10% des femmes en âge de procréer. Derrière la définition pragmatique des critères de Rotterdam, se cache une grande hétérogénéité de formes cliniques et une multiplicité de symptômes, avec une perturbation parfois sévère des fonctions reproductrices, endocriniennes et métaboliques (2).

L'hypothèse de l'origine ovarienne du SOPK a été étayée par des études de biologie moléculaire sur des cellules de la thèque de patientes porteuses. Ces travaux ont montré une élévation constitutionnelle de la transcription d'une enzyme de la stéroïdogénèse responsable d'hyperandrogénie, la 17 $\alpha$ -Hydroxylase (3).

Devant cette maladie ovarienne et les difficultés de stimulation qu'elle engendre, constatant également dans leur pratique certaines anomalies des caractéristiques ovocytaires, nombreux sont les auteurs qui ont émis l'hypothèse d'une qualité ovocytaire et embryonnaire moindre chez les patientes atteintes de cette maladie (4). La prise en charge de leur infertilité reste alors complexe.

Afin d'améliorer les chances de réussite en Assistance Médicale à la Procréation (AMP), de nombreuses études ont été conduites à la recherche de nouveaux biomarqueurs non-invasifs, prédictifs de la qualité ovocytaire ou embryonnaire, du potentiel implantatoire, ou des taux de grossesses. L'étude des seuls critères morphologiques semble en effet montrer ses limites, indiquant la nécessité de trouver des marqueurs complémentaires de viabilité et de qualité des ovocytes et des embryons.

Alors que certains auteurs s'intéressent aux marqueurs embryonnaires (5), l'étude du microenvironnement ovocytaire prend une place grandissante. L'environnement folliculaire influence fortement la capacité développementale de l'ovocyte (6). La qualité des ovocytes joue ensuite un rôle clé dans le développement embryonnaire précoce ; et de leur compétence dépendent de nombreux processus qui se déroulent pendant toute l'ovogenèse. Ces étapes finales de maturation ovocytaire semblent être d'une importance capitale (7). Certains auteurs ont évalué le profil transcriptomique des cellules du cumulus (8), et de nombreux biomarqueurs d'intérêt sont étudiés dans le liquide folliculaire (9,10), composant essentiel du microenvironnement ovocytaire. Les techniques innovantes, comme les techniques dites « omics » (génomique, transcriptomique, métabolomique, protéomique), sont très utilisées dans cet objectif (11,12).

Scalici et al. (2014) (13) ont quantifié pour la première fois le taux d'ADN libre dans le liquide folliculaire (LF). Il s'agit de petits fragments d'ADN double-brin de longueur variable, facilement quantifiables dans le sang mais aussi dans d'autres liquides biologiques (14), issus d'évènements inflammatoires, apoptotiques ou nécrotiques, et libérés soit par relargage passif lors de la destruction des cellules, soit par sécrétion cellulaire active en contexte pathologique (15).

La place de l'ADN libre comme marqueur de l'individualisation de la prise en charge en santé humaine n'est plus à démontrer. Ainsi, en oncologie, l'ADN libre circulant est utilisé comme marqueur diagnostique, pronostique et de suivi des pathologies cancéreuses, y compris des tumeurs de l'ovaire (16). Il a largement contribué à comprendre des mécanismes moléculaires tumoraux et devient une source d'information précise permettant une prise en charge ciblée et adaptée pour chaque patient (17). Il est également déjà appliqué dans le domaine de la gynécologie-obstétrique pour la recherche et le dépistage de certaines pathologies liées à la grossesse mais aussi d'anomalies fœtales (18).

En reproduction humaine, l'ADN libre a déjà été quantifié dans le plasma, le milieu de culture embryonnaire, et le liquide folliculaire. Initialement étudié dans le plasma, il a été montré que des taux d'ADN libre élevés étaient associés à un faible taux de grossesse après FIV (19).

Une étude a montré une association significative entre des taux élevés d'ADN mitochondrial dans le milieu de culture embryonnaire et une diminution de la qualité embryonnaire (20). Les études de Scalici et al. (13) et de Traver et al. (21) ont démontré que les taux élevés d'ADN libre intra-folliculaires étaient significativement associés à une mauvaise qualité embryonnaire à J2/J3. La quantité d'ADN libre présente dans le microenvironnement ovocytaire pourrait donc avoir un effet néfaste sur le développement embryonnaire précoce. L'ADN libre a également été évalué comme un bon marqueur prédictif de la survenue de la grossesse (21).

Il a enfin été montré que les taux d'ADN libre intra-folliculaires étaient significativement plus élevés chez les patientes avec SOPK par rapport aux patientes ayant une réserve ovarienne normale (21). L'objectif de notre étude est de déterminer si le dosage de l'ADN libre intra-folliculaire peut être utilisé comme biomarqueur non invasif prédictif de la qualité embryonnaire chez les patientes présentant un SOPK. Il pourrait ainsi à la fois améliorer la compréhension de la physiopathologie de ce syndrome et constituer une nouvelle approche afin d'optimiser la prise en charge en AMP des patientes qui en sont atteintes.

# **REVUE DE LA LITTERATURE**

# I. LE SYNDROME DES OVAIRES POLYKYSTIQUES

## 1. Définition

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) a été décrit pour la première fois en 1935 par Stein et Leventhal (1). En 1990, une conférence d'experts sponsorisée par le NIH (National Institute of Health) s'est réunie, et les participants se sont accordés sur les critères suivants par ordre d'importance : (I) Hyperandrogénie et/ou hyperandrogénémie, (II) dysovulation, (III) exclusion des autres pathologies engendrant ces symptômes. Cependant l'aspect échographique des ovaires n'était pas pris en compte. La définition du syndrome a ainsi évolué au cours du temps (Tableau 1).

La définition qui reste encore d'actualité de nos jours a été établie en 2003 lors de la conférence de Rotterdam. Ainsi selon le consensus de 2003 (22), réaffirmé en 2012 par le rapport du NIH (23), le SOPK se définit comme l'association d'au moins deux des trois critères suivants : oligo-anovulation, signes cliniques (hirsutisme, acné, alopecie...) et/ou biologiques (élévation du taux de testostérone ou d'androstènedione) d'hyperandrogénie, et présence d'ovaires polykystiques à l'échographie, après exclusion des autres pathologies engendrant ces symptômes (maladie de Cushing, bloc en 21-hydroxylase, hyperprolactinémie, tumeur endocrinienne sécrétante...).

Table 1. Proposed criteria for the definition of PCOS.	
NIH, 1990 <sup>21</sup>	To include all of the following Hyperandrogenism and/or hyperandrogenemia Oligo-ovulation Exclusion of related disorders
Homburg, 2002 <sup>22</sup>	Women with one or more of the following should undergo ovarian sonography Menstrual disturbance Hirsutism Acne Anovulatory infertility. If sonography demonstrates polycystic ovarian morphology, then the diagnosis of PCOS is confirmed. If not then additional biochemical tests are done, and if any of the following is found to be abnormal then the diagnosis of PCOS is made <sup>a</sup> Elevated testosterone Elevated androgen index Elevated LH levels Subnormal glucose: insulin ratio (<4.5)
ESHRE/ASRM (Rotterdam), 2003 <sup>23,24</sup>	To include two of the following, in addition to exclusion of related disorders Oligo- or anovulation Clinical and/or biochemical signs of hyperandrogenism Polycystic ovaries
Modified NIH criteria <sup>25</sup>	To include all of the following Androgen excess (clinical and/or biochemical hyperandrogenism) Ovarian dysfunction (oligo-anovulation and/or polycystic ovarian morphology) Exclusion of other androgen excess or ovulatory disorders
<sup>a</sup> Presumably, related disorders were to be excluded.	

**Tableau 1 : Evolution chronologique des définitions du SOPK (extrait de Goodarzi et al., Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism, 2006)**

L’ovaire polykystique échographique se définit par la présence soit d’au moins 12 follicules de 2 à 9 mm de diamètre sur au moins un ovaire, soit d’une augmentation du volume ovarien supérieur à 10cm<sup>3</sup> (Figure 1).

Chez une femme en âge de procréer, le SOPK peut être ou non associé à des ovaires polykystiques échographiques, à un trouble de l’ovulation, à une hyperandrogénie, à un surpoids ou une obésité, à une insulino-résistance (qui peut se manifester au niveau cutané par un acanthosis nigricans), à un diabète de type 2, à des dyslipidémies, à une hypertension artérielle, à un syndrome métabolique...(24). L’hirsutisme est évalué en pratique clinique selon le score modifié de Ferriman et Gallwey.

Le SOPK est la cause la plus fréquente de dysovulation, puisqu’il touche 5 à 10% des femmes en âge de procréer (25), et qu’il est responsable d’infertilité par anovulation dans 20 à 74% des cas (26–28).

L’insulinorésistance semble jouer un rôle pronostic essentiel chez ces patientes, à la fois sur le risque cardiovasculaire (29), mais aussi possiblement sur la qualité ovocytaire et

l'implantation embryonnaire, pouvant potentiellement compromettre la fertilité (30). Il s'agit donc d'un biais de confusion potentiel dans l'étude de la reproduction des patientes porteuses du SOPK. En outre, la variabilité des autres facteurs d'infertilité rend plus difficile l'évaluation objective de l'impact du SOPK lui-même sur la qualité ovocytaire et embryonnaire.

Le pronostic du syndrome est ainsi lié à la fois à son impact sur les fonctions reproductrices et métaboliques et à ses complications, telles que le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires, les risques obstétricaux, ainsi que certaines tumeurs gynécologiques.



***Figure 1 : Echographie d'un ovaire polykystique (compte des follicules antraux en échographie par technique 2D manuelle par voie endovaginale)***

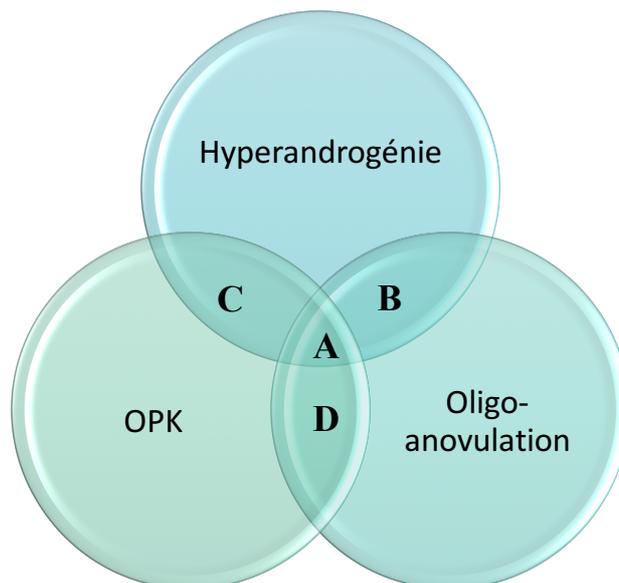
## 2. Phénotypes du SOPK

A partir des critères de Rotterdam, différents phénotypes du syndrome ont été définis (Tableau 2), dont certains sont controversés comme le phénotype D. Le A est considéré comme étant le plus sévère (Figure 2).

Phénotype	Oligo-anovulation	Hyperandrogénie	Morphologique d'OPK
<b>A</b>	OUI	OUI	OUI
<b>B</b>	OUI	OUI	NON
<b>C</b>	NON	OUI	OUI
<b>D</b>	OUI	NON	OUI

**Tableau 2 : Phénotypes du SOPK définis selon les critères de Rotterdam, adapté de Dewailly et al. (2016) (31)**

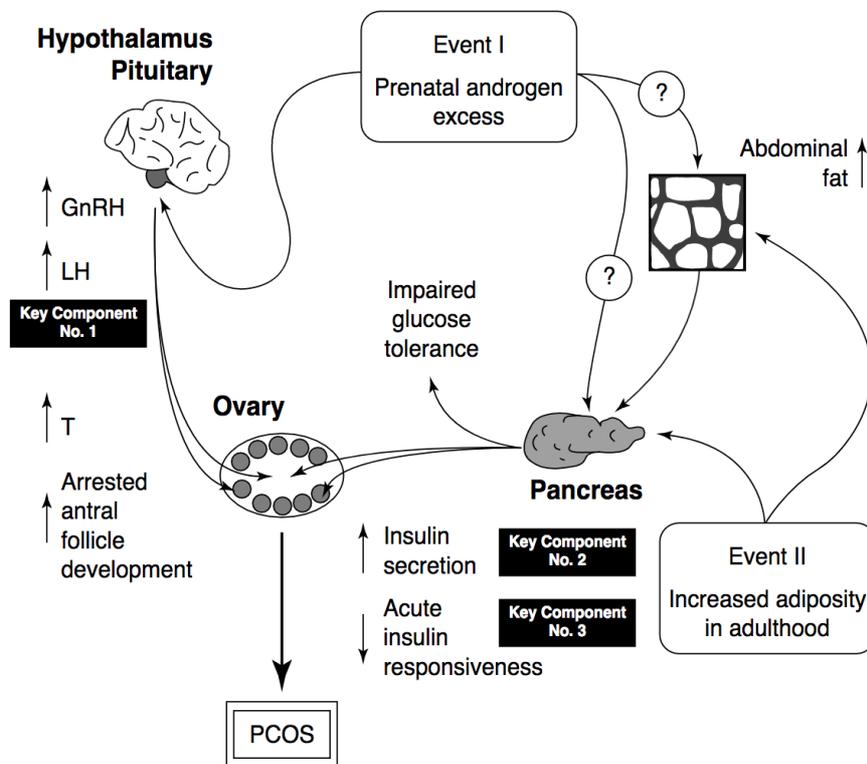
La définition du syndrome reste à l'heure actuelle imparfaite et certains auteurs demandent sa révision (31). Ils souhaitent ainsi l'intégration de nouveaux critères tels que le dosage de l'hormone anti-müllérienne (AMH), mais également la modification de la définition échographique des ovaires polykystiques en raison des avancées technologiques dans ce domaine (32).



**Figure 2 : Schéma représentatif des différents phénotypes du SOPK**

### 3. Physiopathologie

La physiopathologie du SOPK est complexe et multifactorielle et reste à l'heure actuelle incomplètement connue (Figure 3). Elle provient probablement d'une association de facteurs génétiques mais aussi de facteurs environnementaux (33). La fréquence du syndrome semble en effet accrue parmi les membres d'une même famille en comparaison avec la population générale ; un regroupement des cas est constaté (34). De nombreux gènes candidats impliqués dans le développement folliculaire ovarien, la stéroïdogénèse ou encore le métabolisme de l'insuline ont été étudiés (35).



**Figure 3 : Physiopathologie du SOPK, d'après ABBOTT et al, Trends in Endocrinology & Metabolism, 1998**

L'anovulation est un élément central de la physiopathologie. La concentration sérique de la LH (Luteinizing Hormone) est fréquemment élevée chez ces patientes, avec une fréquence accrue des pulses de cette hormone (36). Cette sécrétion semble liée à une augmentation de la fréquence de la sécrétion de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone). En parallèle, la sécrétion de FSH (Follicle-Stimulating Hormone) est insuffisante, et le ratio LH/FSH est augmenté. La LH stimule les cellules de la thèque ce qui induit une production accrue d'androgènes ; ceux-ci sont ensuite convertis en estrogènes dans les cellules de la granulosa par l'aromatase sous l'influence de la FSH (2).

L'insulino-résistance mène, chez ces patientes, à une hyperinsulinémie, entraînant secondairement une diminution du taux de SHBG (Sex Hormon Binding Globuline), protéine de liaison des androgènes, et une hyperandrogénémie (37). L'insuline en excès joue également un rôle sur l'ovaire via son propre récepteur ou via le récepteur à l'IGF-1 et sur les cellules de la thèque et accentue ainsi la production d'androgènes sous l'influence de la LH. L'hyperinsulinisme a ainsi un effet d'amplification du phénotype du syndrome.

Les ovaires avec aspect polykystique présentent de nombreux petits follicules pré-antraux (38). Les androgènes intra-ovariens sont responsables d'un excès de follicules en croissance, avec en parallèle un défaut de sélection du follicule dominant appelé « follicular arrest » lié à une insuffisance relative de la FSH face à l'excès de follicules. La sécrétion d'AMH par ces follicules est donc accrue, responsable d'un effet anti-aromatase en conflit avec la FSH. L'apoptose est également diminuée. On observe ainsi chez ces patientes une anomalie de la maturation folliculaire ainsi qu'une atrésie folliculaire accrue. Ces phénomènes sont responsables des troubles de l'ovulation constatés dans le SOPK.

#### **4. Qualité ovocytaire et embryonnaire chez les patientes avec SOPK**

Devant les difficultés de stimulation engendrées par le SOPK, et observant certaines anomalies ovocytaires, certains auteurs ont émis l'hypothèse d'une qualité ovocytaire et embryonnaire moindre chez les patientes atteintes de cette maladie (4). De nombreuses approches peuvent être envisagées afin d'expliquer cela (39).

Cependant, peu d'études ont comparé la qualité ovocytaire et embryonnaire dans cette population de patientes par rapport à des témoins : la méta-analyse de Heijnen (2006), et

quelques travaux publiés depuis, permettent de dégager certaines conclusions. Elles sont synthétisées dans les Tableaux 3, 4 et 5. Pour toutes ces études, aucune différence significative sur l'âge des populations comparées n'a été constatée.

Paramètre évalué			IMC (indice de masse corporelle)	Nombre d'ovocytes recueillis	Nombre d'ovocytes matures MII	Ovocytes atrétiques (%)	Ovocytes de morphologie normale (%)	Proportion d'ovocytes MII/ovocytes totaux (%)				
Etude	Population	Nombre de cycles										
Sahu et al. (2008) (40)	SOPK	51	<0,05	23,82±3,44	<0,05	14,1±5,7	<0,05	12,1±5,2	NR	NS	NS	
	OPK seuls	50		21,58±1,36		16,1±5						14,3±4,5
	Témoins	104		22,69±2,65		12,4±4,9						10,5±4,4
Plachot et al. (2003) (41)	SOPK	67	NR	458	<0,002	358	NS	NR	<0,05	86,2		
	Témoins	67		363		319				94,2		
Kdous et al. (2009) (42)	SOPK	100	<0,001	26,04±4,7	<0,001	18,1±8,5	<0,001	20	NR	<0,001	67	
	Témoins	200		24,30±3,2		9,4±5,5		35			52	
Esinler et al. (2005) (43)	SOPK	109	NS	<0,01	15,5±7,3	<0,01	13,4±7,1	NR	NR	NS		
	OPK seuls	58			15,3±6,4		13,1±5,6					
	Témoins	232			11,7±6,1		10,3±5,8					
Engmann et al. (1999) (44)	OPK seuls	97	NR	<0,001	20,6	<0,001	11,7	NR	NR	NR		
	Témoins	332			13,1		8,5					
Ludwig et al. (1999) (45)	SOPK	51	NS	<0,01	15,18	0,05	7,98	NR	<0,01	5 ovocytes à 2 PN	NS	
	Témoins	105			10,07		6,31			3,56 ovocytes à 2 PN		
Kumar et al. (2013) (46)	SOPK	77	NS	<0,001	15,9	NR	NR	NR	<0,001	61,1		
	Témoins	115			10,9					74,5		
Sigala et al. (2015) (47)	OPK+SOPK	97	NS	<0,0001	14,4	0,01	10,4	NS	NR	NS		
	Témoins	97			11,3		8					

**Tableau 3 : Revue des différentes études comparant la qualité ovocytaire et embryonnaire des patientes avec SOPK vs témoins : paramètres ovocytaires (NS = Non significatif ; NR= Non renseigné)**

Nous pouvons noter la grande hétérogénéité des populations étudiées, tant par les effectifs que par les critères d'inclusion.

Un nombre d'ovocytes recueillis plus important par ponction chez les patientes atteintes du SOPK fait consensus chez la plupart des auteurs (40–47) (Tableau 3). De la même manière, le

nombre moyen d'ovocytes matures en métaphase II est également supérieur chez les patientes des groupes avec SOPK ou OPK (ovaires polykystiques) seuls, certainement du fait d'un nombre total plus élevé d'ovocytes recueillis dans ces populations.

Les patientes porteuses du SOPK pourraient avoir un moindre taux de maturité ovocytaire mais cela reste controversé : certains auteurs retrouvent un taux inférieur chez ces patientes (41,46), tandis que d'autres études retrouvent un taux de maturité ovocytaire similaire voire supérieur (40,42,43,45,47).

Les résultats en termes de taux de fécondation sont également très différents : Plachot et al. et Heijnen et al. retrouvent des taux de fécondation inférieurs chez les patientes avec SOPK (4,41) bien qu'Heijnen et al. aient montré un nombre d'ovocytes fécondés similaire (4). Cependant, le plus souvent, le taux de fécondation observé est identique dans les populations SOPK et témoins (40,43–45,47), voire même supérieur chez les patientes SOPK (42).

Ludwig et al. ne montrent pas de différence significative concernant le nombre d'ovocytes en métaphase II et le taux de fécondation en ICSI entre les groupes SOPK et témoins. Ils montrent cependant un taux plus élevé de fausses couches en FIV dans le groupe SOPK, et évoquent la possibilité d'une influence négative de facteurs cytoplasmiques sur le développement embryonnaire en l'absence d'arguments pour une cause nucléaire (45).

L'hétérogénéité des indications d'ICSI expliquerait l'hétérogénéité des résultats de la littérature concernant le taux de fécondation. L'ICSI n'est pas recommandée de manière systématique dans les cas de SOPK, quand une fécondation *in vitro* est nécessaire. Cependant certaines études tendent à observer dans cette population un taux de fécondation supérieur en ICSI par rapport à la technique de FIV classique. Hwang et al. (48) a par exemple fait cette observation au cours de son étude, et évoqué la possibilité d'une anomalie de la zone pellucide qui pourrait expliquer le taux élevé d'échec de fécondation lors des FIV classiques chez les patientes porteuses du SOPK, anomalie qui serait court-circuitée par l'utilisation de la micro-injection.

Une étude récente s'est intéressée aux différences en termes de qualité ovocytaire entre patientes avec ovaires polykystiques (OPK seuls ou SOPK) et patientes témoins en ICSI (47). Les résultats de ce travail montrent une qualité ovocytaire équivalente entre les cohortes d'ovocytes matures des deux groupes, basée sur l'étude détaillée des anomalies extracytoplasmiques (forme des ovocytes, fragmentation du globule polaire, anomalie de la

zone pellucide, espace péri-vitellin élargi ou présentant des débris), et intracytoplasmiques (présence de vacuoles, granulose). Les patientes avec ovaires polykystiques ne semblent donc pas présenter une morphologie ovocytaire altérée.

### *La morphologie embryonnaire*

Concernant la morphologie embryonnaire, il est étonnant de constater que la plupart des études semblent montrer une qualité similaire voire supérieure chez les patientes avec SOPK par rapport aux témoins (41–43,45,46), avec une proportion plus élevée d'embryons de grade 1 observée par ces auteurs (Tableau 4). Heijnen et al. ont montré que le taux d'embryon transféré par ovocyte prélevé n'était pas significativement différent (4). Le même constat a été fait plus récemment pour le nombre d'embryons transférés par plusieurs auteurs (40–43,47).

Paramètre évalué			Taux de fécondation (%) 2 PN	Embryons de bonne qualité		Taux de clivage	Nombre de cycles avec transfert de blastocystes (%)	Nombre d'embryons transférés	Nombre de cycles avec congélation d'embryons	
Etude	Population	Nombre de cycles								
Sahu et al. (2008) (40)	SOPK	51	NS	NS		NR	NS	NS	NS	
	OPK seuls	50								
	Témoins	104								
Plachot et al. (2003) (41)	SOPK	67	<0,02	52	<0,05	75	NR	NS	NS	
	Témoins	67		60,8		67,7				
Kdous et al. (2009) (42)	SOPK	100	<0,001	75	<0,01	69	98,5	NR	NS	
	Témoins	200		63,7		53				95
Esinler et al. (2005) (43)	SOPK	109	NS	<0,05		33,3	NR	NA	NS	NS
	OPK seuls	58				34,2				
	Témoins	232				24,6				
Engmann et al. (1999) (44)	OPK seuls	97	NS	NR		NS	NR	NR	NR	
	Témoins	332								
Ludwig et al. (1999) (45)	SOPK	51	NS	<0,05	27,35	NR	NR	<0,01	2,69	NR
	Témoins	105							20,3	
Kumar et al. (2013) (46)	SOPK	77	NR	<0,05	28	NR	NR	NR	NR	
	Témoin	115			50					
Sigala et al. (2015) (47)	OPK+SOPK	97	NS	NS		NS	NR	NS	NR	
	Témoins	97								

**Tableau 4 : Revue des différentes études comparant la qualité ovocytaire et embryonnaire des patientes avec SOPK vs témoins : paramètres embryonnaires (NS = Non significatif ; NR= Non renseigné ; NA= Non applicable)**

Les divergences observées sur certains paramètres peuvent s'expliquer par une grande hétérogénéité des études concernant en particulier les critères d'inclusion des patientes, l'indication de prise en charge, la technique de mise en fécondation utilisée, les critères d'observation et d'évaluation de la qualité ovocytaire et embryonnaire avec la description des stades, ainsi que la stratégie de transfert choisie. La morphologie des ovocytes avant mise en fécondation est également peu comparée dans les différentes études présentées.

### *Résultats des tentatives*

La majorité des études publiées retrouve des taux de grossesses et de naissances comparables chez les patientes avec SOPK par rapport à des témoins, voire supérieurs pour certains auteurs (44).

Ce consensus semble étayé par la méta-analyse de Heijnen et al. (2006), qui a inclus différentes études comparant les résultats obtenus après FIV chez 458 patientes avec SOPK, comparées à 694 patientes contrôle (4).

Leurs conclusions ne montrent pas de différence significative sur les taux de grossesse clinique par cycle, par ponction ovocytaire et par embryon transféré, de même que sur le nombre de naissances vivantes par cycle entamé.

Ces résultats semblent être confirmés par les autres études ayant comparé les résultats en FIV chez les patientes avec et sans SOPK (Tableau 5).

Cette méta-analyse n'a en revanche pas inclus d'études ayant comparé les résultats en ICSI.

Le choix de la technique utilisée semble pourtant bien avoir un impact sur les résultats obtenus, plusieurs auteurs ayant constaté des taux de fécondation inférieurs en FIV classique par rapport à l'ICSI (43).

L'analyse des issues des tentatives de FIV est difficile en raison des nombreuses comorbidités (hyper-androgénie, obésité, diabète, hyperplasie endométriale...) qui peuvent s'associer à ce syndrome et modifier par eux-mêmes les résultats en FIV. Ainsi, une large étude vient de confirmer la relation proportionnelle néfaste entre l'augmentation de l'indice de masse corporelle et l'échec en FIV, que les patientes soient porteuses du SOPK ou non (49). Selon le degré d'obésité des patientes incluses dans le groupe SOPK des études, le pronostic des résultats en FIV peut donc varier.

Paramètre évalué			Taux d'implantation (%)	Taux de grossesse clinique/transfert d'embryon (%)	Taux de grossesse clinique/cycle (OR)	Taux de fausses couches (%)		Taux de naissances vivantes (OR)		
Etude	Population	Nombre de cycles								
Sahu et al. (2008) (40)	SOPK	51	NS	NS	NR	<0,05	31	NR		
	OPK seuls	50					15,4			
	Témoins	104					14			
Plachot et al. (2003) (41)	SOPK	67	NR	NR	NS	NR	NR	NR		
	Témoins	67								
Kdous et al. (2009) (42)	SOPK	100	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
	Témoins	200								
Esinler et al. (2005) (43)	SOPK	109	NS	<0,05	66	NR	<0,05	11,8	NR	
	OPK seuls	58								59,6
	Témoins	232								44,3
Engmann et al. (1999) (44)	OPK seuls	97	NS	NR	0,05	1,69	NS	0,03	1,82	
	Témoins	332							1	
Ludwig et al. (1999) (45)	SOPK	51	NR	NS	NR	<0,05	41,67	NR	NR	
	Témoins	105								21
Kumar et al. (2013) (46)	SOPK	77	NR	NR	NS	NR	NR	NR	NR	
	Témoins	115								
Sigala et al. (2015) (47)	OPK+SOPK	97	0,005	37,4	0,04	46,4	NR	NR	0,04	44,3
	Témoins	97		22						33,7

**Tableau 5 : Revue des différentes études comparant la qualité ovocytaire et embryonnaire des patientes avec SOPK vs témoins : résultats des tentatives (NS = Non significatif ; NR= Non renseigné)**

Enfin, de rares études se sont intéressées plus particulièrement à la qualité ovocytaire et embryonnaire en cas de syndrome d'hyperstimulation ovarienne (HSO), complication fréquente lors de la prise en charge de ces patientes en fécondation in vitro. L'une a montré une diminution significative du taux d'ovocytes matures et du taux de fécondation dans le groupe avec HSO, imputable à la proportion élevée de SOPK dans ce groupe, mais sans altération de la qualité des embryons transférés ni des taux de grossesse (50).

L'étude de Fábregues et al., en revanche, montre des taux de fécondation similaires entre les deux groupes et ne montre pas de différence en termes de qualité ovocytaire et embryonnaire, y compris chez les patientes avec SOPK (51).

Au regard de l'ensemble de ces études, il est très difficile de conclure à une différence de qualité ovocytaire et embryonnaire entre les patientes avec SOPK et les groupes de patientes

contrôle, que ce soit en termes de morphologie, de cinétique ou de chance de succès, comme cela avait été décrit précédemment par Heijnen et al. (4).

Néanmoins, le nombre élevé d'ovocytes recueillis dans cette population lors de la prise en charge en AMP nous amène à rechercher les meilleurs critères de sélection possible des embryons à transférer. En effet, face à des cohortes embryonnaires parfois conséquentes, l'amélioration de cette sélection pourrait optimiser les chances de réussite des tentatives pour ces patientes.

### *Blastocystes*

Très peu d'études se sont intéressées aux blastocystes, à leur taux de formation et à leur qualité chez les femmes avec SOPK par rapport à des témoins.

D'après l'étude de Wissing et al. (2014a), qui avait pour but d'étudier la cinétique des embryons depuis la fécondation jusqu'au stade blastocyste chez les patientes avec SOPK, il semble que seuls les embryons de patientes porteuses de SOPK avec hyper-androgénie aient un développement précoce plus long. Cela laisse planer un doute sur le fait que cette anomalie du développement embryonnaire pourrait être due à l'hyper-androgénie et non au SOPK (52).

Dans une autre étude, les auteurs ont conclu à une viabilité, une cinétique embryonnaire et un taux de formation des blastocystes comparables entre les embryons des patientes avec et sans SOPK (53).

Hardy et al. ont montré un taux similaire d'embryons pouvant se développer jusqu'au stade de blastocyste entre les patientes du groupe SOPK et les témoins (54). Ils ont cependant observé des différences : les embryons du groupe SOPK avec anovulation présentaient un taux de fragments plus faible et un clivage plus rapide que ceux du groupe des patientes témoin, et avaient une cavitation plus précoce et un nombre de cellules à J5 supérieur par rapport au groupe témoin, ce qui pourrait leur conférer un meilleur pronostic d'implantation.

On observe dans ces études quelques différences au niveau de la cinétique embryonnaire entre les patientes avec SOPK et les patientes témoins, mais aucune différence significative n'est visible quant au taux et à la cinétique de formation des blastocystes.

Cependant, trop peu d'études sont disponibles à l'heure actuelle pour étayer de façon plus approfondie cette approche. De plus, la seule étude morphologique des embryons ne permet pas d'affirmer la qualité des blastocystes étudiés, bien qu'Alfarawati et al. aient démontré une association entre qualité morphologique et aneuploïdie des blastocystes (55).

### *Fausses couches*

La méta-analyse de Kollmann et al. (56) n'a pas permis de conclure quant à la prévention du risque de fausses couches après FIV en contexte de SOPK, malgré 40 articles analysés. L'imputabilité du SOPK dans la survenue de fausses couches est d'ailleurs discutée (57,58): Le risque de fausse couche spontanée après FIV chez les patientes avec SOPK est controversé ; certains auteurs retrouvent un risque accru dans cette population de patientes (45), d'autres non (42,43).

Il est alors intéressant de noter que Wang et al. (2001) ont démontré que ce risque de fausse couche après AMP est significativement plus élevé chez les patientes avec SOPK en analyse univariée, mais que ce risque devient non significatif en analyse multivariée après ajustement par l'IMC (Indice de Masse Corporelle) et le traitement utilisé (59), montrant ainsi le rôle de la forte prévalence de l'obésité dans cette population de patientes dans le taux de fausses couches observé.

## **II. BIOMARQUEURS EN AMP**

### **1. Morphologie ovocytaire et embryonnaire**

Afin de réduire le risque de grossesse multiple tout en garantissant les meilleurs taux de succès possibles, le choix d'une stratégie de transfert embryonnaire unique (« eSET » : elective single-embryo transfer) est de plus en plus fréquent et nécessite une méthode fiable de sélection. Cette sélection embryonnaire est donc un enjeu majeur.

Dans la pratique actuelle, les données morphologiques sont fréquemment l'unique critère de choix pour la sélection du ou des embryons à transférer ou à vitrifier le cas échéant, ainsi que des embryons à stopper, quel que soit le stade embryonnaire. L'évaluation de ces critères repose sur une observation microscopique à des stades précis. Ces critères morphologiques évoluent et s'affinent avec le stade du développement de l'embryon ; ceci permet à un stade plus tardif une analyse séquentielle de son évolution au cours du temps. Cette méthode présente l'avantage d'être simple à effectuer, non-invasive, et peu coûteuse ; elle reste cependant ponctuelle et garde une part non négligeable de subjectivité et de variabilité inter-opérateur (60).

Cette pratique a montré ses limites puisque les taux actuels de succès en FIV restent insatisfaisants : 85% des embryons transférés ne s'implantent pas, et seuls 20 à 25% des tentatives de FIV aboutiront à une naissance vivante (61). Ces résultats laissent penser que la seule étude des critères morphologiques est insuffisante pour prédire de manière satisfaisante la viabilité et l'implantation d'un embryon. A l'inverse, la pratique montre que certains embryons présentant une mauvaise qualité, selon les critères morphologiques établis, se sont pourtant implantés et ont donné lieu à des grossesses puis des naissances (62).

Afin d'affiner les critères de sélection, différentes classifications ont été proposées, propres à chaque stade de développement :

- Au stade zygote, le « Z-score » est basé sur l'évaluation du nombre, de la position et de l'alignement des pronuclei (63). L'intérêt de ce score reste cependant très controversé.
- La présence d'un clivage précoce lors de l'observation entre la 25<sup>ème</sup> et la 27<sup>ème</sup> heure post-fécondation (64) a été associée à un meilleur potentiel implantatoire (65).
- Les embryons clivés au stade précoce de leur développement (J2-J3) sont évalués selon une classification déterminant leur grade, basée sur le nombre et la régularité des blastomères ainsi que la proportion de fragments (66).
- Au stade de blastocyste (J5-J6), la classification de Gardner et Schoolcraft est la plus communément utilisée. Elle se base sur le niveau d'expansion du blastocèle, ainsi que sur l'aspect de la masse cellulaire interne et du trophoctoderme (67).

Dans l'objectif d'améliorer nos stratégies de sélection embryonnaire, la technologie « time-lapse » a connu récemment un développement important. Il s'agit de systèmes de monitoring en continu du développement embryonnaire, permettant une évaluation morphocinétique de l'embryon (61). Cette technologie est accompagnée par le développement d'algorithmes basés sur cette étude morphocinétique afin de prédire le potentiel implantatoire des embryons et d'affiner ainsi leur sélection. Elle fait actuellement l'objet d'études pour évaluer son impact sur les issues de tentatives en comparaison avec les incubateurs standard (68).

Le choix du transfert de plusieurs embryons pour améliorer les taux de succès après FIV est accompagné d'un risque accru de grossesse multiple et de complications obstétricales et néonatales (69). Le développement de la stratégie de transfert mono-embryonnaire nécessite donc l'amélioration de notre évaluation du potentiel implantatoire des embryons.

## **2. Développement de nouveaux biomarqueurs**

Différentes approches ont été abordées à la recherche de nouvelles méthodes d'évaluation des ovocytes et des embryons. L'approche par la technique du PGS (Preimplantation Genetic Screening) ou screening génétique pré-implantatoire n'est pour l'heure pas autorisée en France, et constitue une méthode invasive puisqu'elle implique la réalisation d'une biopsie de l'embryon afin d'obtenir son matériel génétique (70).

D'autres approches innovantes comme les techniques dites « omics » (génomique, transcriptomique, métabolomique, protéomique) ont une place grandissante dans la recherche de nouveaux biomarqueurs non-invasifs. Elles permettent l'étude de différents éléments, qu'il s'agisse de fluides biologiques comme le liquide folliculaire, de tissus avec les cellules du cumulus ou les cellules de la granulosa, ou encore du milieu de culture embryonnaire.

Le profil transcriptomique des cellules du cumulus a été étudié, différents gènes ont été identifiés comme étant impliqués dans la compétence des ovocytes et des embryons et pourraient ainsi constituer des biomarqueurs d'intérêt (8,71–74).

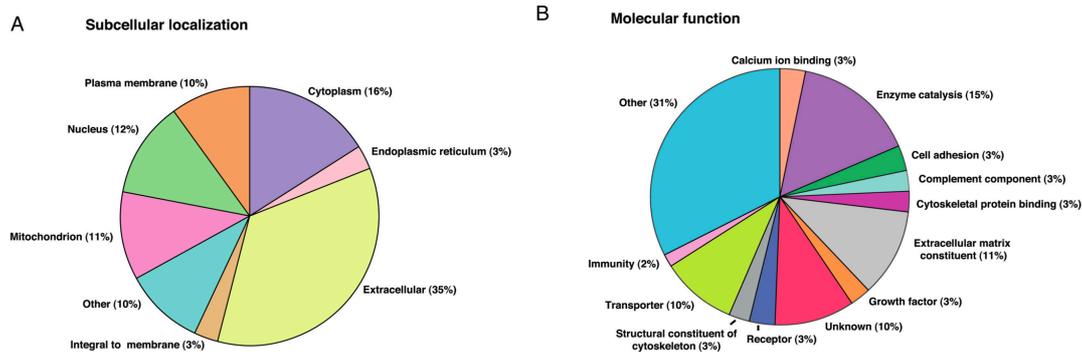
Seli et al. ont évalué le profil métabolomique du milieu de culture des embryons afin d'étudier le lien entre le sécrétome de l'embryon et sa viabilité, indépendamment de la morphologie (75).

### **3. Le liquide folliculaire**

Le liquide folliculaire (LF) est formé dans les follicules antraux en croissance, et contient des sécrétions issues des cellules de la granulosa et de la thèque mais aussi du plasma via un gradient osmotique (76).

Le liquide folliculaire est donc un fluide complexe et est un composant essentiel du micro-environnement ovocytaire. Il permet les interactions entre l'ovocyte et les cellules folliculaires, et est impliqué dans la croissance et la maturation folliculaire ainsi que dans l'acquisition de la capacité développementale de l'ovocyte (77). Il est donc la source de nombreux biomarqueurs non invasifs, pouvant influencer sur la qualité ovocytaire et embryonnaire.

Ambekar et al. (2015) se sont intéressés au profil protéomique du liquide folliculaire des patientes avec SOPK comparé à celui de patientes témoins (78). De rares auteurs avaient auparavant étudié ce profil chez les patientes avec SOPK (79,80). Ils ont ainsi démontré l'altération du profil d'expression de 186 protéines chez ces patientes par rapport aux témoins (sur- ou sous-exprimées), ayant des fonctions extrêmement variées (Figure 4). Ces protéines peuvent ainsi avoir un rôle dans la structure cellulaire (membrane plasmique...) (Figure 4A) mais également avoir des fonctions moléculaires (enzymes, facteurs de croissance...) (Figure 4B). La dérégulation de ces protéines entraîne l'altération de nombreux processus impliqués dans la folliculogénèse. Ces travaux permettent ainsi de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la physiopathologie du syndrome.



**Figure 4 : Protéines dont l'expression est altérée dans le LF des patientes avec SOPK (extrait et adapté de Ambekar et al., 2015) : protéines à localisation subcellulaire (A), protéines avec fonctions moléculaires (B)**

D'autres auteurs se sont également intéressés au profil protéomique et métabolomique du LF à la recherche de nouveaux biomarqueurs en AMP (6,81–83).

Le liquide folliculaire a donc été la source de nombreuses études qui ont rapporté que des variations de concentrations de certains composants du LF pouvaient être reliées à la qualité ovocytaire et au développement embryonnaire précoce, tels que la leptine, l'inhibine B, ou encore la lactoferrine (6,9,10,84–86).

L'environnement folliculaire joue un rôle essentiel dans la capacité développementale de l'ovocyte (6). En raison des troubles de la folliculogenèse constatés chez les patientes avec SOPK, l'étude de cet environnement par la recherche de biomarqueurs dans le LF paraît donc pertinente. Notre équipe a mis en évidence pour la première fois dans le LF un biomarqueur d'intérêt dans l'optimisation de la prise en charge en AMP : l'ADN libre. Ce marqueur s'inscrit dans le panel des acides nucléiques circulants, dont l'intérêt dans la prise en charge de l'infertilité a été démontré (87).

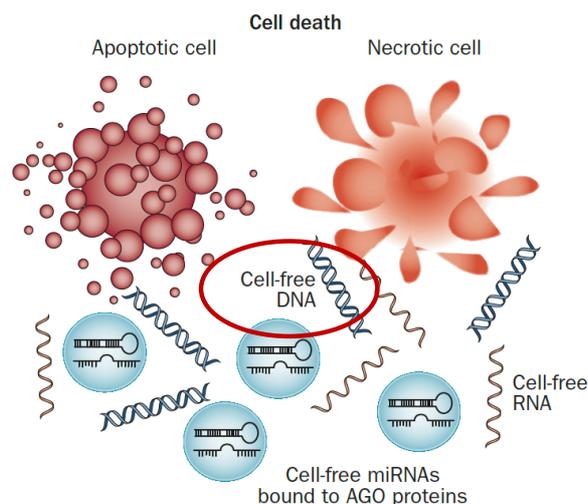
### III. ADN LIBRE

#### 1. Généralités

L'ADN libre a été détecté pour la première fois dans le sang circulant par Mandel et Metais en 1948 (88). Il s'agit de petits fragments d'ADN double brin, de faible poids moléculaire, et de longueur variable : on trouve des fragments courts de 70 à 200 paires de bases ou des fragments plus longs allant jusqu'à 21kb (89).

L'ADN libre a été mis en évidence dans le sang mais également dans de nombreux autres fluides biologiques tels que l'urine, la sueur, le liquide céphalo-rachidien (LCR), ou encore le liquide amniotique et le liquide séminal (90–94).

Il peut être issu de deux mécanismes différents. Il peut s'agir premièrement d'un relargage passif d'ADN nucléaire ou mitochondrial lors de la destruction cellulaire par apoptose ou par nécrose (15) (Figure 5). L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée, alors que la nécrose est le plus souvent pathologique. Les macrophages jouent un rôle essentiel dans l'élimination des débris cellulaires par phagocytose. En condition physiologique, les taux d'ADN libre circulant restent donc faibles (95). Après ce phénomène, l'ADN libre peut partiellement être relargué au sein de nucléosomes. Les macrophages, en cas de phagocytose excessive, peuvent éliminer leur contenu ou entrer en lyse cellulaire et libérer à leur tour l'ADN libre issu des cellules phagocytées (95).



**Figure 5 : Relargage d'ADN libre après apoptose ou nécrose cellulaire, extrait et adapté de Schwarzenbach et al., Nature Reviews cancer, 2014 (96)**

Deuxièmement, l'ADN libre peut provenir d'un mécanisme de relargage actif résultant d'une sécrétion cellulaire spontanée (97).

Ces différents mécanismes expliquent le constat de taux accrus d'ADN libre dans certaines situations physiopathologiques : l'âge avancé (98), les pathologies cancéreuses (16), les maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux disséminé (99), la grossesse (100), ainsi que des situations de stress particulières comme le sepsis (101) ou encore le syndrome coronarien aigu (102).

L'ADN libre a donc fait l'objet de nombreuses études dans le cadre de multiples pathologies et a pris une place grandissante en santé humaine.

Il est tout particulièrement étudié dans le domaine de l'oncologie. En cas de pathologie cancéreuse tumorale, deux types de mécanismes semblent expliquer l'accroissement des taux d'ADN libre sérique : une sécrétion active par les cellules tumorales elles-mêmes, mais également un relargage lié au processus apoptotique et nécrotique des cellules avoisinant la tumeur (103).

La longueur des fragments d'ADN libre varie selon le processus qui en est à l'origine : en cas d'apoptose les fragments présentent une longueur constante et de petite taille (185-200 paires de bases), alors qu'en cas de nécrose ils sont de longueur variable.

Umetani et al. ont ainsi mis au point une méthode permettant de calculer l'intégrité de l'ADN, définie par le ratio des fragments longs sur les fragments courts d'ADN libre dosé par PCR quantitative (qPCR). On peut ainsi connaître l'origine des fragments détectés. Le calcul de l'intégrité de l'ADN libre constitue alors un biomarqueur d'intérêt dans le sérum pour l'évaluation de certains cancers (104).

## **2. Place de l'ADN libre en santé humaine**

Le dosage de l'ADN libre constitue dorénavant un marqueur essentiel dans le domaine de l'oncologie, où il a de multiples intérêts. Le relargage d'ADN libre dans le sang circulant est issu à la fois des cellules cancéreuses elles-mêmes, mais également des cellules du microenvironnement tumoral.

Il peut donc constituer en premier lieu un marqueur diagnostique. Une concentration en ADN libre dans le sérum des patients présentant une pathologie cancéreuse a en effet été démontrée plus élevée que chez les patients sains dans de nombreux types de cancers (16,105).

La mesure des taux d'ADN libre, la détermination du type de fragments par la mesure de l'index d'intégrité de l'ADN ainsi que la recherche d'altérations génétiques et épigénétiques sur ces fragments peuvent concourir au diagnostic d'une pathologie cancéreuse (16).

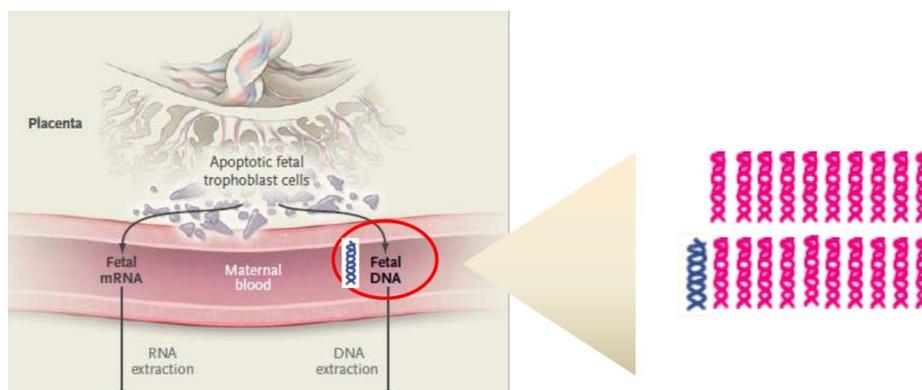
Mais il peut également constituer un marqueur pronostic : en effet, certains travaux ont montré que les taux d'ADN libre augmentent avec la progression de la tumeur (106), ainsi qu'en présence de métastases (107).

Enfin, l'ADN libre peut également s'avérer utile dans le suivi et l'adaptation de la thérapeutique. La décroissance des taux d'ADN libre est un indicateur utile de l'efficacité du traitement (108). L'absence d'une diminution attendue permet donc également de supposer la présence de cellules tumorales résiduelles.

L'ADN libre constitue désormais un marqueur très utile dans la prise en charge de nombreux cancers, à toutes les étapes de la maladie. Les techniques actuelles permettent ainsi une prise en charge ciblée et adaptée à chaque patient (17).

L'ADN libre a également montré son utilité dans le domaine de la gynécologie et de l'obstétrique. Il s'agit premièrement d'un marqueur diagnostique et pronostique dans la prise en charge des tumeurs de l'ovaire et du cancer du sein (108,109).

Au cours de la grossesse, l'ADN circulant présent dans le sang maternel est constitué d'un mélange d'ADN libre maternel et d'ADN libre fœtal d'origine placentaire, dans des proportions variables selon le stade (110) (Figure 6). Il participe ainsi à la détection de pathologies obstétricales : en effet, des concentrations élevées en ADN libre ont été associées à certaines complications de la grossesse telles que la pré-éclampsie ou le HELLP syndrome, la menace d'accouchement prématuré, ou encore l'anomalie d'invasion placentaire (18).



**Figure 6 : Passage de l'ADN libre fœtal dans la circulation maternelle (extrait de [www.adnexpert.fr](http://www.adnexpert.fr))**

L'ADN libre fœtal joue également un rôle essentiel dans la recherche d'anomalies fœtales dans le cadre du diagnostic prénatal non invasif. Il peut s'agir de la recherche d'aneuploïdie fœtale pour la trisomie 13,18 et 21 ; mais aussi de certaines maladies génétiques comme par exemple la thalassémie ou encore de la détermination du sexe fœtal pour certaines maladies liées à l'X ou transmises par le chromosome Y (18,111,112).

Les tests basés sur l'ADN libre circulant dans le sang maternel bouleversent les conditions du dépistage de la trisomie 21 fœtale, et ont fait récemment l'objet de nouvelles recommandations par la Haute Autorité de Santé en mai 2017 (113).

### **3. L'ADN libre en reproduction humaine**

L'ADN libre a été étudié en lien avec l'infertilité dans différents milieux : le sang, le milieu de culture embryonnaire, le liquide séminal, et pour la première fois par notre équipe dans le liquide folliculaire. La technique de calcul de l'index d'intégrité de l'ADN libre appliquée dans ce milieu a permis de démontrer que ce marqueur présent dans l'environnement folliculaire et donc dans l'ovaire est majoritairement d'origine apoptotique (13).

Initialement étudié dans le plasma, des taux élevés d'ADN libre ont été associés à de faibles taux de grossesse après FIV (19).

L'hypothèse d'un lien entre une augmentation du taux d'ADN libre et une anomalie de la réserve ovarienne a été évoquée par Scalici et al. (2014) et Traver et al. (2014) (18,89). Cette hypothèse a été étayée par l'étude de Traver et al. (2015) qui a retrouvé des taux d'ADN libre significativement plus élevés chez les patientes présentant une anomalie de la réserve ovarienne, qu'il s'agisse d'une insuffisance ovarienne prématurée (IOP) ou d'un SOPK, par rapport aux patientes normo-répondeuses (21). Ce constat peut s'expliquer par des phénomènes d'atrésie folliculaire accrue chez ces patientes, qu'elle soit physiologique avec le vieillissement ovarien, ou pathologique en contexte d'IOP, via l'apoptose des cellules de la granulosa (114,115).

L'ADN libre a également été évalué comme biomarqueur de la qualité embryonnaire. Notre équipe a mis en évidence pour la première fois la présence d'ADN libre dans le LF de patientes prises en charge en FIV, par la collecte individuelle du LF de chaque follicule et la

mesure des taux d'ADN libre dans chacun de ces liquides (13). Ce travail a permis de démontrer une corrélation significative et négative entre le taux d'ADN libre intra-folliculaire et la taille des follicules pré-ovulatoires, suggérant des phénomènes accrus d'apoptose et de nécrose dans les follicules de plus petite taille par rapport à ceux de grande taille. Cette même étude a également montré que les taux élevés d'ADN libre intra-folliculaire étaient significativement associés à une mauvaise qualité embryonnaire au 3<sup>ème</sup> jour de développement. Le même constat a été fait dans l'étude de Traver et al. (2015) (21). La richesse en ADN libre de l'environnement ovocytaire semble donc avoir un effet néfaste sur le développement précoce de l'embryon. Ces résultats ont été confirmés par une récente étude qui a montré que les taux élevés d'ADN libre intra-folliculaires étaient associés à une baisse de la qualité embryonnaire et du taux de grossesse. Dans cette étude, il a été montré que des taux élevés d'ADN libre étaient responsables d'un stress oxydatif et d'une apoptose accrue des cellules de la granulosa (116).

Stigliani et al. (2013) ont mesuré l'ADN libre relargué par les embryons clivés dans le milieu de culture embryonnaire. Ils ont montré que des taux élevés d'ADN mitochondrial dans ce milieu étaient significativement associés à une mauvaise qualité embryonnaire, et notamment à une fragmentation importante des embryons à J2 et à J3 du développement (20). Une autre étude a montré un lien entre ces taux mesurés dans le milieu de culture embryonnaire à J3 et les taux de blastulation et d'implantation (117).

L'étude de Czamanski-Cohen et al. (2013) a montré que des taux élevés d'ADN libre plasmatique mesurés deux semaines après le transfert embryonnaire étaient significativement associés à une diminution des taux de grossesse après FIV (19). Ces résultats ont été confirmés par Traver et al. qui ont montré que la mesure du taux d'ADN libre intra-folliculaire est un bon marqueur prédictif de la survenue de la grossesse (21).

L'ADN libre est désormais un marqueur important dans la recherche et la thérapeutique de diverses pathologies humaines. Il constitue également un biomarqueur non-invasif prometteur dans la prise en charge de nos patients en AMP.

# **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## **1. Population étudiée**

Il s'agit d'une étude prospective réalisée dans le service de Biologie de la Reproduction du CHU de Montpellier. Au total, nous avons inclus 36 patientes présentant un SOPK et ayant bénéficié d'une prise en charge en AMP avec Fécondation in Vitro conventionnelle (FIVc) ou ICSI (Intracytoplasmic sperm injection). Le diagnostic du SOPK a été établi selon les critères de la classification de Rotterdam, correspondant à l'association d'au moins deux critères parmi les trois suivants : oligo- ou anovulation ; signes cliniques (hirsutisme, acné, alopecie...) et/ou biologiques (élévation du taux de testostérone ou d'androstènedione) d'hyperandrogénie ; et présence d'ovaires polykystiques à l'échographie ; après exclusion des autres pathologies engendrant ces symptômes (maladie de Cushing, bloc en 21-hydroxylase, hyperprolactinémie, tumeur endocrinienne sécrétante...). La description de la morphologie de l'ovaire polykystique est définie de la façon suivante : soit au moins 12 follicules de 2 à 9 mm de diamètre sur chaque ovaire, soit une augmentation du volume ovarien supérieur à 10 cm<sup>3</sup>. Pour des raisons organisationnelles, le recrutement s'est déroulé sur une première période du 01/09/2014 au 31/01/2015 puis sur une seconde période du 12/05/2017 au 04/07/2017. Le consentement préalable à l'utilisation du liquide folliculaire à des fins de recherche a été recueilli pour chaque patiente.

## **2. Déroulement de la stimulation ovarienne et de la ponction ovocytaire**

La stimulation ovarienne a été réalisée dans le cadre d'un protocole agoniste ou antagoniste. L'axe gonadotrope était régulé soit par une désensibilisation à l'aide d'un agoniste de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) (DECAPEPTYL®, IpsenPharma, France), soit par blocage de l'axe à l'aide d'un antagoniste de la GnRH (CETROTIDE®, Merck Serono, Royaume-Uni ; ou ORGALUTRAN®, Organon, Pays-Bas) ; suivi d'une stimulation ovarienne par de la FSH (Hormone folliculo-stimulante) recombinante (r-FSH) (PUREGON®, MSD, France ; GONAL F®, Merck Serono, Royaume-Uni ; BEMFOLA®, Finox Biotech, Suisse) ou par une association de FSH et LH (Hormone lutéinisante) d'origine urinaire (MENOPUR®, Ferring, Suisse). Les critères de choix du protocole de traitement utilisé étaient le contexte clinique de la patiente, son âge, son IMC, le rang de la tentative ainsi que sa réponse aux éventuelles stimulations antérieures.

Le monitoring de la stimulation ovarienne consistait en un suivi échographique à partir du 6<sup>ème</sup> jour de stimulation par la FSH pour la mesure de la taille des follicules, associé à un suivi par prises de sang pour réaliser les dosages hormonaux (dosages de l'estradiol, de la LH et de la progestérone). Après une durée de stimulation d'une dizaine de jours, l'ovulation était déclenchée par injection d'hCG recombinante (250 µg, OVITRELLE®, Merck Serono, Royaume-Uni) ou par la triptoréline en protocole antagoniste. Les critères de déclenchement étaient les suivants : présence d'au moins 3 follicules  $\geq$  17mm ; endomètre d'épaisseur  $\geq$  7mm ; taux d'estradiol corrélé au nombre de follicules attendus ; ainsi qu'une progestéronémie  $\leq$  1.5ng/mL. Les patientes avec SOPK font l'objet d'une attention particulière afin d'évaluer et de prévenir le risque d'hyperstimulation ovarienne. 36h après le déclenchement avait lieu la ponction ovocytaire au bloc opératoire, sous anesthésie locale ou générale, par voie transvaginale à l'aide d'une pompe d'aspiration et sous contrôle échographique. L'ensemble des follicules ont été aspirés, le liquide ainsi recueilli dans des tubes stériles acheminés rapidement au laboratoire à l'aide d'une valise thermostatée à 37°C.

Les patientes ont ensuite bénéficié d'un soutien de phase lutéale par l'administration de progestérone par voie vaginale (UTROGESTAN®, Besins International, France) débutée le soir suivant la ponction et poursuivie jusqu'au jour du test de grossesse.

### **3. Procédure de FIV conventionnelle ou FIV-ICSI**

#### *Mise en fécondation*

Les complexes cumulo-ovocytaires (CCO) ont été recueillis à partir du liquide folliculaire obtenu lors de la ponction et isolés.

Dans le cadre d'une Fécondation in vitro conventionnelle (FIVc), les CCO recueillis ont été placés séparément dans des gouttes de 20µL de milieu de culture. L'insémination par les spermatozoïdes obtenus après préparation du sperme du conjoint a été faite 38h après l'injection de déclenchement de l'ovulation.

Dans le cas d'une procédure de FIV-ICSI, les ovocytes ont été décoronisés par un processus enzymatique à l'aide de la hyaluronidase. Après décoronisation, la maturité ovocytaire ainsi que leur morphologie (aspect de la zone pellucide (ZP), de l'espace péri-vitellin et du

cytoplasme) ont été observées avant l'étape de micro-injection des ovocytes matures qui a lieu 39h post déclenchement.

Après la mise en fécondation, les ovocytes ont été mis en culture individuellement dans des gouttes de 20µL de milieu G-1<sup>TM</sup>PLUS (Vitrolife, Göteborg, Suède) sous huile à l'étuve à 37°C, sous 5% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub>, 89% N<sub>2</sub> et dans une atmosphère humide.

### *Fécondation et culture embryonnaire J2-J3*

Dix-huit à vingt heures après la mise en fécondation par insémination ou micro-injection et après décoronisation mécanique dans le cas d'une FIVc, les ovocytes ont été observés au microscope. La fécondation est alors appréciée par la présence de deux pronuclei (2 PN) et de deux globules polaires (2 GP), signes d'une fécondation proprement dite.

Une seconde lecture entre la 25<sup>ème</sup> et la 27<sup>ème</sup> heure permet la mise en évidence d'un éventuel clivage précoce ou d'un effacement des PN.

Aux 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> jour du développement, la morphologie embryonnaire a été évaluée selon différents critères : le nombre de blastomères, la taille et la régularité des blastomères, et le taux de fragmentation. La classification de BLEFCO modifiée (Tableau 6) a permis à partir de ces critères de classer les embryons selon 4 grades (le grade 1 étant celui décrivant les embryons de meilleure qualité).

Critère Morphologique	Grade				
	1	2	3		4
Nombre de blastomères à J2	4-5	4-5	4-5	<4 ou >5	-
Nombre de blastomères à J3	6-8	6-8	6-8	<6 ou >8	-
Régularité des blastomères	Régulier	Régulier	Régulier ou Irrégulier		Régulier ou Irrégulier
Taux de fragmentation (%)	≤ 10	11-24	25-40		> 40

***Tableau 6 : Classification BLEFCO modifiée, Classification des critères morphologiques et évaluation de la qualité embryonnaire à J2 et à J3***

Cette classification a permis de déterminer quels étaient les embryons dits top qualité (soit grade 1 ou 2) ; ils présentent un nombre de 4 à 5 blastomères à J2 ou de 6 à 8 blastomères à J3, de taille égale, avec un taux de fragmentation inférieur à 25%. La majorité des patientes ont bénéficié d'un transfert au 3<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire. Le transfert d'un ou de deux embryons était réalisé sous écho-guidage, à l'aide d'un cathéter Frydman® Classic (CCD, France).

### ***Culture prolongée (J5-J6)***

Les embryons n'ayant pas été transférés à J3 ou dans le cas d'un transfert prévu à J5, sont mis en culture prolongée jusqu'au 5<sup>ème</sup> voire au 6<sup>ème</sup> jour de développement. Ils sont alors placés à partir du 3<sup>ème</sup> jour dans des gouttes individuelles de 10µL de milieu de culture G-2<sup>TM</sup>PLUS (Vitrolife, Göteborg, Suède). Les blastocystes obtenus font l'objet d'une observation au microscope et sont évalués morphologiquement selon la classification de Gardner et Schoolcraft (Tableau 7).

Ainsi seuls les blastocystes ayant atteint au moins le grade B3 (blastocyste en cours d'expansion) et présentant un trophoctoderme et une masse cellulaire interne de score A ou B ont pu faire l'objet d'un transfert ou d'une vitrification. Les blastocystes de qualité inférieure n'ont pas été conservés.

Critères morphologiques					
Grade		Cavité du blastocèle			
B1	Jeune blastocyste	< 50% du volume de l'embryon			
B2	Blastocyste	> 50% du volume de l'embryon	<b>Masse Cellulaire Interne</b>	<b>Trophoctoderme</b>	
B3	Blastocyste en cours d'expansion	Totalité du volume de l'embryon	Compacte, nombreuses cellules	Nombreuses cellules, épithélium cohésif	<b>A</b>
B4	Blastocyste expansé	Totalité du volume de l'embryon + ZP amincie			
B5	Blastocyste en voie d'éclosion	Totalité du volume de l'embryon + évagination TE	Légèrement regroupées, plusieurs cellules	Peu de cellules et peu cohésives, épithélium moins régulier	<b>B</b>
B6	Blastocyste éclos	Éclosion totale	Très peu de cellules	Très peu de cellules, larges	<b>C</b>

***Tableau 7 : Evaluation de la qualité embryonnaire au stade blastocyste selon les critères morphologiques établis par la Classification des blastocystes selon Gardner et Schoolcraft ((67), 1999)***

### ***Résultat du transfert***

Un dosage sérique quantitatif de  $\beta$ -hCG a été réalisé pour chaque patiente ayant bénéficié d'un transfert d'embryon au 15<sup>ème</sup> jour suivant la ponction ovocytaire, et éventuellement renouvelé 48h plus tard. En cas de test positif, la réalisation d'une échographie obstétricale a permis de confirmer la grossesse clinique par la présence d'un sac gestationnel intra-utérin et d'une activité cardiaque fœtale.

## **4. Obtention et préparation des échantillons de liquide folliculaire**

Après en avoir isolé les complexes cumulo-ovocytaires, les échantillons de liquide folliculaire (LF) clairs et peu hématiques obtenus pour une même patiente ont été poolés. 15mL de ce mélange ont été centrifugés à une vitesse de 3000g durant 15 minutes. Le surnageant clair a alors été prélevé, puis filtré à l'aide d'une seringue et de filtres ayant des pores d'un diamètre de 0.22 $\mu$ m afin d'en éliminer tous les résidus et débris cellulaires. Le filtrat ainsi obtenu a ensuite été aliquoté et congelé rapidement à -80°C jusqu'à la réalisation du dosage.

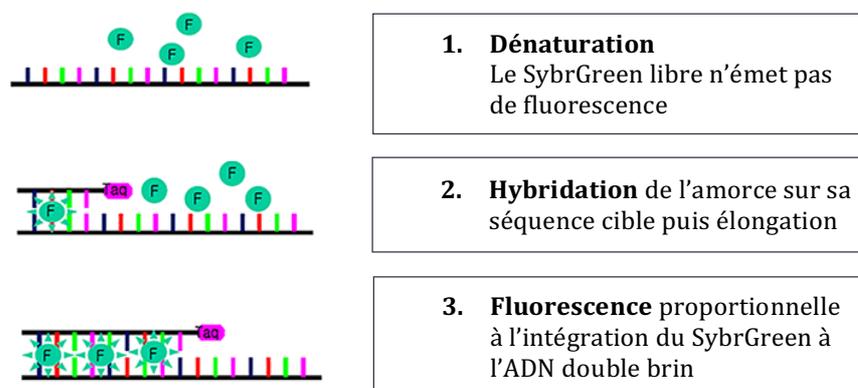
## **5. Dosage de l'ADN libre dans les échantillons**

### ***Extraction de l'ADN libre***

La première étape du dosage consiste en l'extraction de l'ADN libre à partir des échantillons de LF centrifugés et filtrés. 20 $\mu$ L de LF ont été mélangés à 20 $\mu$ L d'une préparation tamponné contenant 25mL/L de détergent Tween-20, 50mL/L de Tris 1M à pH 7.6 (50 mM dans le tampon final), et 200  $\mu$ L/L d'EDTA 0.5 M (1mM dans le tampon final). 16 $\mu$ g de protéinase K (QIAGEN) ont ensuite été ajoutés afin de digérer le mélange, placé pendant 20 minutes dans un bloc chauffant à 50°C. Il a ensuite été inactivé et insolubilisé en étant placé pendant 5 minutes à 95°C. Cette étape est suivie d'une centrifugation de 5 minutes à 10000g à une température de 4°C. Les tubes ont été mis sur glace et le surnageant, contenant les fragments d'ADN libre, a été recueilli et congelé à -80°C.

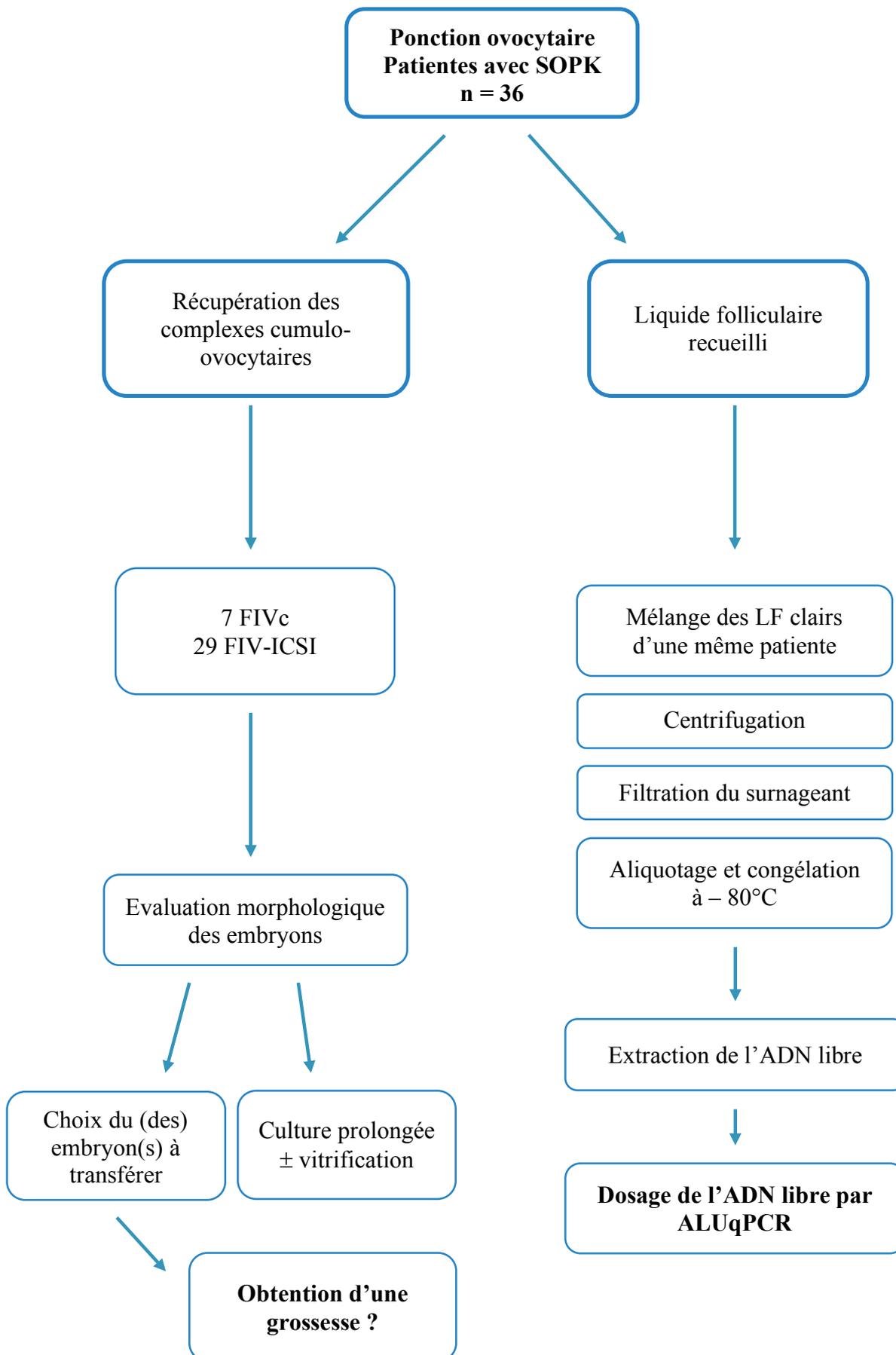
## Quantification de l'ADN libre par ALU-qPCR

La quantification de l'ADN libre extrait a été réalisée selon la méthode initialement décrite par Umetani et al. (2006) (104). Il s'agit d'une PCR quantitative avec amplification des séquences ALU, ou ALU-qPCR, en utilisant des amorces spécifiques de ces séquences. Les séquences ALU sont de courtes séquences intercalées et répétées d'ADN non-codant, très abondantes dans le génome humain. La méthode nécessite l'utilisation d'amorces ALU 115 sens (5'CCTGAGGTCAGGAGTTCGAG-3') et anti-sens (5'CCCGAGTAGCTGGATTACA-3') générant des amplicons de 115 paires de bases, et s'hybridant à la fois sur les fragments courts et longs d'ADN libre. Pour chaque échantillon, 2µL d'extrait sont ajoutés au mélange réactionnel constitué de 2.5µM de chaque amorce ALU 115 sens et anti-sens et de 5µL de 2X LightCycler®480 SYBR Green I master mix (contenant l'enzyme ADN Taq polymérase, les nucléotides et l'agent intercalant fluorescent SybrGreen™ libre) (ROCHE Applied Science). La réaction de qPCR est réalisée à l'aide du dispositif LightCycler®480 (ROCHE Applied Science), et comprend une première étape d'activation thermique de l'ADN polymérase à 95°C pendant 10 minutes, suivie de 40 cycles d'amplification avec dénaturation, hybridation, et élongation. Le composé SYBR Green I se fixe spécifiquement sur l'ADN double-brin au cours de l'étape d'élongation, et émet alors une fluorescence verte détectée et mesurée en temps réel (Figure 7). La quantité d'ADN libre dans l'échantillon a ensuite été déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue à partir d'une gamme allant de 0.01pg à 10ng d'ADN génomique réalisée par des dilutions en cascade. Chaque échantillon a été analysé en duplicate et un contrôle négatif a été intégré dans chacune des plaques de PCR.



**Figure 7 : Mode d'action du SYBR Green™**

**Figure 8 : Schéma récapitulatif du déroulement de l'étude**



## 6. Analyse statistique

Les caractéristiques cliniques de la population étudiée, de la stimulation ovarienne et les résultats des tentatives de FIVc ou FIV-ICSI ont été exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type (ET) ou en pourcentages. La normalité a été testée par le test de Shapiro-Wilk, et des tests de Mann-Whitney et Kruskal-Wallis ont été utilisés pour analyser les variables quantitatives.

Une analyse multivariée (régression logistique) a été effectuée afin de déterminer l'influence de certains facteurs sur l'obtention d'une grossesse clinique.

De plus, le seuil d'ADN libre intra-folliculaire utilisé pour séparer la population en deux groupes a été déterminé à partir de la construction d'une courbe ROC (*Receiver Operating Characteristic*) et le calcul de l'aire sous la courbe (AUC) avec un intervalle de confiance à 95%. Pour le seuil choisi, la sensibilité est de 68,75% et la spécificité de 40%.

Pour l'ensemble des tests statistiques réalisés, le seuil de significativité retenu est  $p < 0.05$ . Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SAS® University Edition (SAS Institute, Cary, N.C.).

# **RESULTATS**

## **1. Caractéristiques de la population**

Les caractéristiques générales de la population étudiée sont détaillées dans le Tableau 8. La moyenne d'âge est de  $32.6 \pm 3.9$  ans. La durée d'infertilité moyenne des couples pris en charge était de  $4.2 \pm 2$  ans. Pour 36% des couples il s'agissait d'une première tentative, alors que les 64% restant avaient déjà bénéficié au préalable d'au moins une tentative de FIVc ou de FIV-ICSI.

L'étiologie de l'infertilité était d'origine mixte dans 55% des cas, et exclusivement féminine dans 42% des cas. L'indice de masse corporelle des patientes (IMC) varie entre 18.0 et 37.5 avec une moyenne de  $25.2 \pm 5.4$  kg/m<sup>2</sup>, 47% des patientes de la population ayant un IMC supérieur à 25.

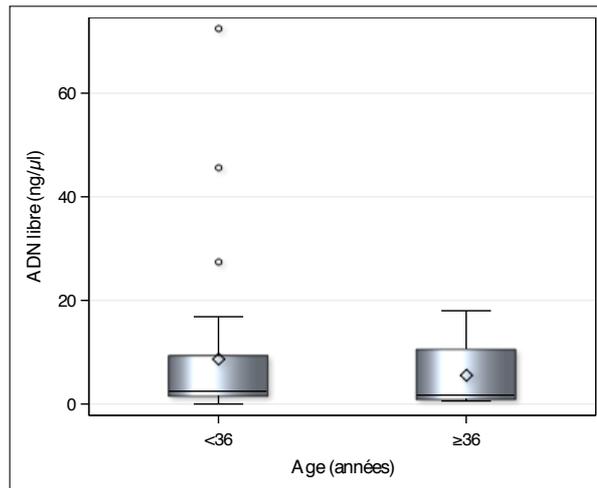
La concentration moyenne en ADN libre dans les liquides folliculaires était de  $8.02 \pm 14.4$  ng/μL, avec une médiane de 2.42 ng/μL.

## **2. Données cliniques**

Nous avons comparé les taux d'ADN libre intra-folliculaires en fonction de différents seuils concernant les données cliniques et biologiques. Ces résultats sont détaillés dans le Tableau 8. Il n'y a pas de différence significative entre les taux d'ADN libre chez les patientes de moins de 36 ans (seuil fixé dans notre centre comme âge limite pour définir la population de référence) et de plus de 36 ans (Figure 9) ; ni entre les différents groupes définis selon l'IMC.

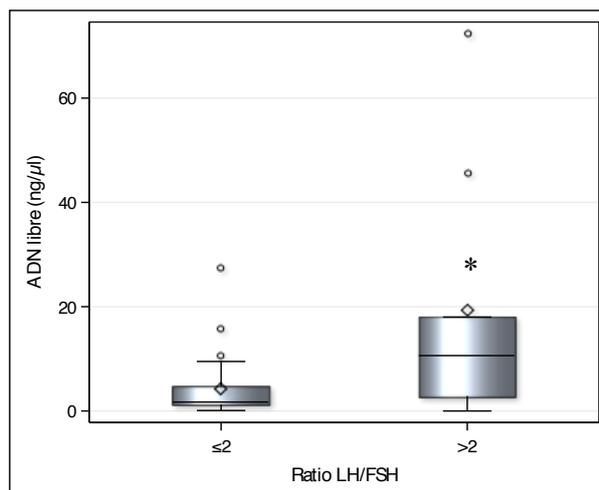
Variable	Moyenne	n (total=36)	Min-Max	Ecart- type	ADN libre (ng/ $\mu$ l) Médiane [Q1-Q3]	p
<b>Age (Années)</b>	32.6	-	26-41	3.9	-	-
< 36 ans	-	29	-	-	2.47 [1.38;9.31]	0.8 NS
$\geq$ 36 ans	-	7	-	-	1.72 [0.79;10.62]	
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	25.2	-	18-37.5	5.4	-	-
$18 \leq IMC < 25$	-	19	-	-	4.37 [0.96;10.67]	0.46 NS
$25 \leq IMC < 30$	-	9	-	-	2.47 [1.45;5.86]	
$IMC \geq 30$	-	8	-	-	1.43 [0.77;3.19]	
<b>Durée d'infertilité (Années)</b>	4.2	-	1-11	2	-	-
1-4	-	26	-	-	2.53 [0.96;6.29]	0.86 NS
$\geq$ 5	-	10	-	-	1.73 [1.38;10.67]	
<b>Etiologie de l'infertilité</b>						
<i>Masculine</i>	-	1	-	-	2.63	0.96 NS
<i>Féminine</i>	-	15	-	-	1.72 [1.36;10.67]	
<i>Mixte</i>	-	20	-	-	2.24 [0.78;9.4]	
<i>Idiopathique</i>	-	0	-	-	-	
<b>Infertilité primaire</b>	-	17	-	-	1.50 [0.59;4.64]	0.25 NS
<b>Infertilité secondaire</b>	-	19	-	-	2.63 [1.49;9.49]	
<b>Rang de la tentative</b>	2	-	1-6	1.2	-	-
1	-	13	-	-	1.50 [1.43;2.60]	0.44 NS
> 1	-	23	-	-	4.37 [0.86;10.67]	
<b>Bilan féminin en début de cycle</b>						
FSH (UI/L)	5.5	-	1.9-9.8	1.7	-	-
LH (UI/L)	9.5	-	3-56	10.1	-	-
Ratio LH/FSH	1.8	-	0.43-11.4	1.9	-	-
$\leq 2$	-	27	-	-	1.72 [0.96;4.64]	<b>0.03</b>
$> 2$	-	9	-	-	10.62 [2.60;18]	
E2 (pg/mL)	46.3	-	11.3-318	49.7	-	-
AMH (ng/mL)	7.5	-	3-17.1	3.4	-	-
$\leq 5$	-	9	-	-	1.72 [1.43;4.40]	0.9 NS
$> 5$	-	27	-	-	2.47 [0.96;9.49]	
CFA	29.6	-	10-59	12.4	-	-
< 30	-	20	-	-	1.61 [0.88;5.25]	0.2 NS
$\geq 30$	-	16	-	-	3.48 [1.43;10.06]	
<b>FIVc</b>	-	7	-	-	1.45 [0.96; 4.36]	0.25 NS
<b>ICSI</b>	-	29	-	-	2.60 [1.38;10.62]	

**Tableau 8 : Caractéristiques cliniques de la population et taux d'ADN libre intra-folliculaire (ET= Ecart-type, NS= Non significatif, Q1= quartile inférieur, Q3= quartile supérieur)**



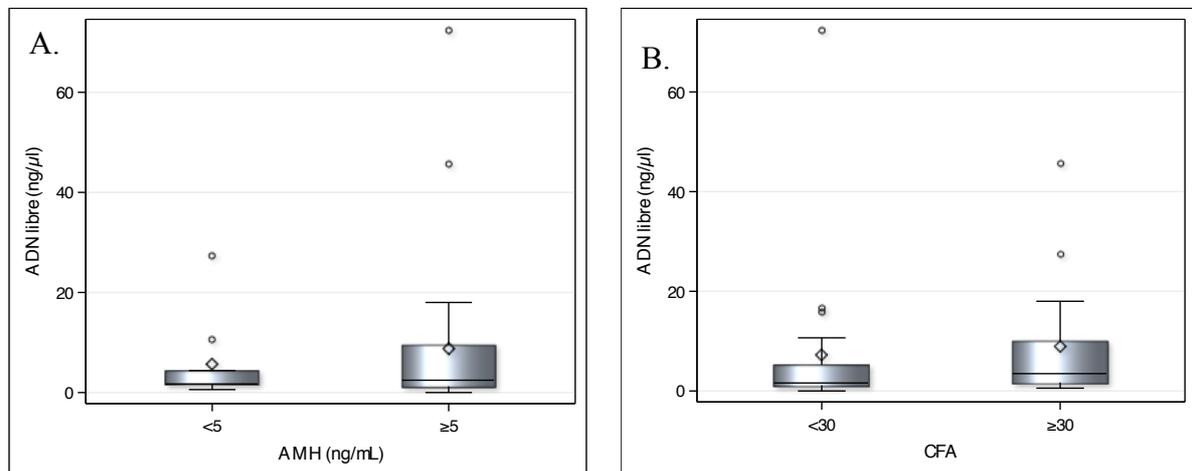
**Figure 9 : Comparaison des taux d'ADN libre en fonction de l'âge ( $p=0.8$ )**

De même, aucune différence n'a été retrouvée selon la durée et l'étiologie de l'infertilité, ni selon le rang de la tentative ou selon s'il s'agissait d'une infertilité primaire ou secondaire. Pour l'étude du bilan féminin de base fait en début de cycle, nous avons pu constater que les patientes pour lesquelles le ratio LH/FSH (taux de LH sur taux de FSH dosés à J3 du cycle) est supérieur à 2 ont des taux d'ADN libre intra-folliculaires significativement plus élevés que les patientes pour lesquelles le ratio est inférieur ou égal à 2 (Figure 10).



**Figure 10 : Comparaison des taux d'ADN libre en fonction du ratio LH/FSH (\* $p=0.03$ )**

En revanche, il n'a pas été mis en évidence de différence significative des taux d'ADN libre en fonction du bilan de réserve ovarienne, que ce soit pour la valeur de l'AMH dont le seuil a été fixé à 5 ou du CFA (compte des follicules antraux) avec un seuil à 30 follicules antraux (Figure 11).



**Figure 11 : Comparaison des taux d'ADN libre intra-folliculaire en fonction de l'AMH ( $p=0.9$ ) (A) et du CFA ( $p=0.2$ ) (B)**

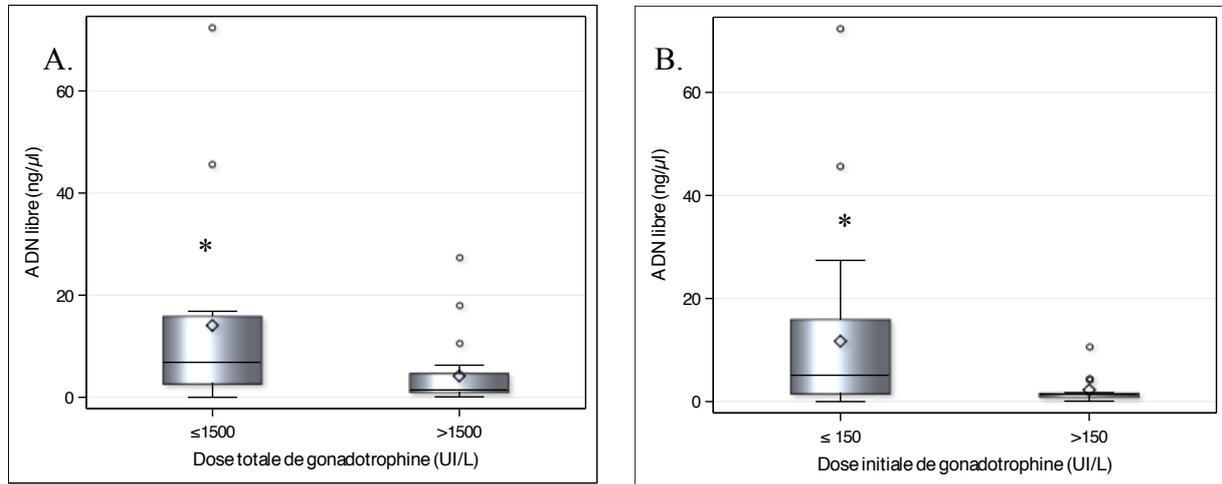
### 3. Paramètres de la stimulation

La comparaison des taux d'ADN libre en fonction des différents paramètres liés à la stimulation ovarienne est présentée dans le Tableau 9. Nous n'avons pas constaté de différence significative de ces taux selon le type de protocole utilisé ni selon la durée de la stimulation ou le bilan hormonal effectué au moment du déclenchement.

En revanche, les taux d'ADN libre intra-folliculaire sont significativement plus élevés chez les patientes ayant reçu une dose totale de gonadotrophine faible, inférieure ou égale à 1500 UI/L, comparativement aux patientes ayant reçu plus de 1500 UI/L. De même, on observe une augmentation significative de ces taux chez les patientes ayant reçu les doses initiales de gonadotrophines les plus faibles, inférieures ou égales à 150 UI/L (Figure 12).

Variable	Moyenne	n (total=36)	Min-Max	Ecart- type	ADN libre (ng/μl) Médiane [Q1-Q3]	p
<b>Protocole agoniste</b>	-	14	-	-	2.61 [0.97;15.88]	
<b>Protocole antagoniste</b>	-	22	-	-	1.58 [1.36;4.64]	0.28 NS
<b>Traitement pour la stimulation ovarienne</b>						
Durée de la stimulation (jours)	10.8	-	9-21	2.5	-	-
≤ 10	-	21	-	-	1.72 [1.36;9.31]	
> 10	-	15	-	-	2.47 [0.97;18]	0.5 NS
Dose totale de gonadotrophines (UI/L)	1709.2	-	984-3975	680.2	-	-
≤ 1500	-	14	-	-	6.85 [2.59;15.88]	
> 1500	-	22	-	-	1.44 [0.86;4.64]	<b>0.03</b>
Dose initiale de gonadotrophines (UI/L)						
≤ 150	-	22	-	-	5.11 [1.5;15.88]	
> 150	-	14	-	-	1.4 [1.08;1.75]	<b>0.01</b>
<b>Bilan hormonal au déclenchement</b>						
Taux d'E2 (pg/mL)	2092	-	333-4300	994.4	-	-
≤ 2000	-	20	-	-	2.11 [0.91;8.24]	
> 2000	-	16	-	-	3.19 [1.37;9.4]	0.8 NS
Taux de Progestérone (ng/mL)	0.62	-	0.2-1.7	0.36	-	-
Taux de LH (UI/L)	1.7	-	0.1-5.7	1.4	-	-

**Tableau 9** : Paramètres de la stimulation et bilan hormonal au déclenchement de l'ovulation (ET=Ecart-type, NS=Non significatif)



**Figure 12** : Comparaison des taux d'ADN libre intra-folliculaire en fonction de la dose totale de gonadotrophine reçue au cours de la stimulation (\* p=0.03) (A) et de la dose initiale de gonadotrophine (\* p=0.03) (B)

#### 4. Résultats des tentatives : ovocytes et développement embryonnaire

Le Tableau 10 présente les résultats du recueil ovocytaire et de la fécondation. En moyenne,  $12 \pm 5.5$  ovocytes ont été recueillis lors de la ponction ovarienne, et  $9.1 \pm 4.4$  ovocytes en moyenne étaient matures au stade métaphase II (MII) soit 75% des ovocytes recueillis. Les résultats ne mettent pas en évidence de différence significative des taux d'ADN libre intra-folliculaires en fonction du nombre d'ovocytes, de la maturité ovocytaire, et des taux de fécondation que ce soit en FIVc ou après ICSI. Le taux de clivage précoce était de 44%. Les taux d'ADN libre étaient significativement plus élevés dans le LF des patientes ayant obtenu au moins un embryon clivé précoce, et chez les patientes ayant un taux de clivage précoce de plus de 50%.

Variable	Moyenne	ET	n (total=36)	ADN libre (ng/ $\mu$ l) Médiane [Q1-Q3]	p
<b>Ovocytes recueillis</b>	12	5.5	-	-	-
< 10	-	-	11	4.4 [0.79;10.62]	0.7 NS
$\geq 10$	-	-	25	2.02 [1.36;9.31]	
<b>Ovocytes matures (MII) (ICSI)</b>	9.1	4.4	-	-	-
< 6	-	-	9	4.64 [0.97;10.62]	0.5 NS
$\geq 6$	-	-	20	2.24 [1.4;9.4]	
Ovocytes matures / Ovocytes totaux	0.75	0.19	-	-	-
ratio $\leq 0.75$	-	-	13	2.60 [0.87;4.64]	0.17 NS
ratio $> 0.75$	-	-	16	6.29 [1.43;18]	
<b>Fécondation</b>					
2 pronuclei (2PN)	5.5	3.6	-	-	-
% fécondation (FIV)	0.60	0.24	-	-	-
< 0.60	-	-	3	1.36 [0.79;4.37]	0.46 NS
$\geq 0.60$	-	-	5	1.45 [1.43;1.72]	
% fécondation (ICSI)	0.67	0.27	-	-	-
< 0.60	-	-	8	1.44 [0.91;6.54]	0.31 NS
$\geq 0.60$	-	-	20	4.52 [1.59;10.08]	
<b>Lecture à 25-27h</b>					
Clivage précoce	2.6	2.6	-	-	-
0	-	-	10	1.16 [0.59;2.47]	<b>0.02</b>
$\geq 1$	-	-	25	4.40 [1.50;10.62]	
Clivage précoce / 2PN	0.44	0.48	-	-	-
ratio $\leq 0.5$	-	-	28	1.88 [0.97;7.8]	<b>0.04</b>
ratio $> 0.5$	-	-	6	8.24 [4.64;45.78]	

**Tableau 10 : Taux d'ADN libre en fonction des caractéristiques ovocytaires et des résultats de la fécondation**

Les caractéristiques du développement embryonnaire sont détaillées dans le Tableau 11. En moyenne,  $6.6 \pm 3.9$  embryons ont été obtenus au 2<sup>ème</sup> jour du développement.

Variable	Moyenne	ET	n (total=36)	ADN libre (ng/ $\mu$ l) Médiane [Q1-Q3]	p
<b>J2</b>					
Nombre d'embryons	6.6	3.9	—	—	—
< 5	—	—	12	2.92 [0.88;8.24]	0.8 NS
$\geq 5$	—	—	23	2.47 [1.43;9.49]	
Embryons grade 1-2	3	3.2	—	—	—
$\leq 2$	—	—	18	1.44 [0.59;4.64]	<b>0.04</b>
$> 2$	—	—	17	4.4 [1.75;9.49]	
Embryons grade 1-2 / embryons J2	0.38	0.31	—	—	—
ratio $< 0.2$	—	—	11	1.43 [0.56;2.6]	0.1 NS
ratio $\geq 0.2$	—	—	24	4.38 [1.44;10.08]	
<b>J3</b>					
Embryons grade 1-2	2	2.2	—	—	—
$\leq 2$	—	—	21	1.45 [0.79;9.49]	0.15
$> 2$	—	—	13	4.37 [2.02;9.31]	NS
Embryons grade 1-2 / embryons J3	0.27	0.27	—	—	—
ratio $< 0.2$	—	—	15	1.72 [1.36;10.62]	0.7 NS
ratio $\geq 0.2$	—	—	19	2.60 [1.45;9.31]	
Nombre moyen de blastomères par embryon	8.3	1.7	—	—	—
$< 6$	—	—	3	4.64 [1.36;6.29]	0.6 NS
6-8	—	—	15	1.75 [1.43;4.37]	
$> 8$	—	—	16	5.13 [1.17;13.73]	
<b>J5</b>					
Blastocystes	2.8	3.4	—	—	—
Blastocystes / embryons mis en culture prolongée	0.46	0.33	—	—	—
$\leq 0.5$	—	—	15	1.75 [0.59;4.4]	0.46
$> 0.5$	—	—	9	2.47 [1.43;15.88]	NS
<b>Nombre d'embryons utiles</b>	3	2.3	—	—	—
$< 2$	—	—	4	1.11 [0.61;3.61]	0.25
$\geq 2$	—	—	25	2.47 [0.97;9.31]	NS
Nombre d'embryons utiles / Nombre d'embryons	0.48	0.26	—	—	—
$< 0.2$	—	—	3	1.36 [0.86;18]	0.89
$\geq 0.2$	—	—	26	2.11 [0.96;5.86]	NS

**Tableau 11 : Taux d'ADN libre et paramètres du développement embryonnaire de J2 à J5**

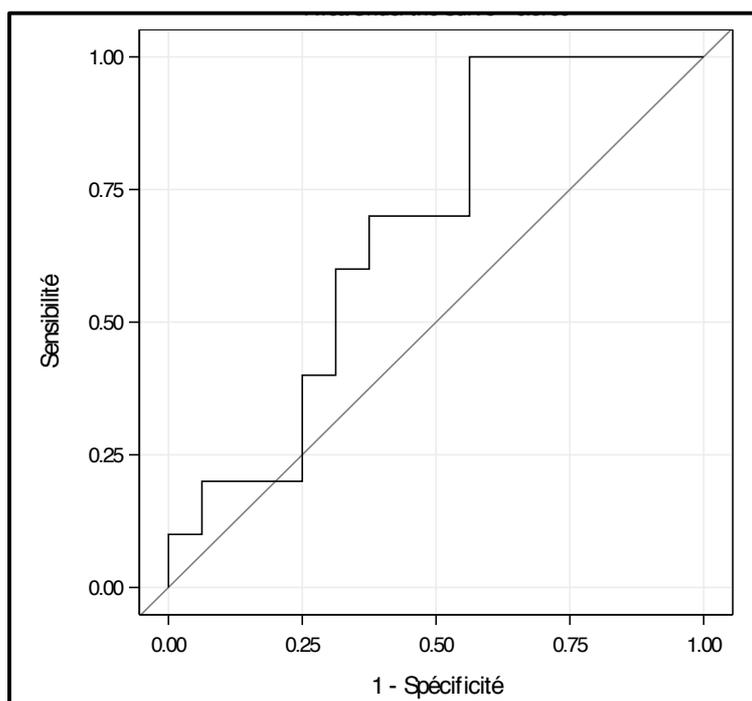
Les résultats présentés indiquent des taux d'ADN libre significativement plus élevés chez les patientes ayant obtenu moins d'embryons top qualité (grade 1-2) à J2 ( $p= 0.04$ ). En revanche, cette différence devient non significative lorsque l'on compare le taux d'embryons grade 1-2 par rapport au nombre total d'embryons à J2 ( $p= 0.1$ ). Il n'a pas été mis en évidence de différence des taux d'ADN libre selon la qualité embryonnaire à J3 ni selon le nombre de blastocystes obtenus ou le taux de blastulation. De même il n'a pas été observé de lien avec le nombre d'embryons utiles, défini par le nombre total d'embryons ayant été transférés ou vitrifiés au sein d'une même cohorte ; ni avec le taux d'embryons utiles calculé par rapport au nombre total d'embryons de la cohorte.

## **5. Probabilité d'obtention d'une grossesse**

Il n'a pas été démontré de différence significative des taux d'ADN libre en fonction de l'obtention d'une grossesse clinique ( $p = 0.15$ ).

La réalisation d'une analyse multivariée intégrant le taux d'ADN libre, le ratio du taux de LH/FSH, la dose totale de gonadotrophines ainsi que le nombre d'embryons de grade 1-2 à J2 n'a pas permis de mettre en évidence une variable permettant de prédire la survenue d'une grossesse.

Afin de comparer les paramètres des patientes ayant des taux bas et des taux élevés d'ADN libre intra-folliculaire, nous avons établi un seuil à partir de la construction d'une courbe ROC en analyse univariée (Figure 13). L'aire sous courbe (AUC = Area Under Curve) représentant le potentiel prédictif du taux d'ADN libre sur l'obtention d'une grossesse clinique était de 0.675 avec une sensibilité de 68.75% et une spécificité de 40%. Le seuil ainsi établi est de 4.3950 ng/ $\mu$ L.



**Figure 13 : Courbe ROC pour l'évaluation de la probabilité d'obtention d'une grossesse clinique en fonction du taux d'ADN libre intra-folliculaire (AUC = 0.675, sensibilité = 68.75%, spécificité = 40%)**

## **6. Evaluation des différents paramètres selon le seuil d'ADN libre déterminé**

Grâce au seuil d'ADN libre déterminé à l'aide de la courbe ROC, nous avons pu comparer différents paramètres en fonction du taux d'ADN libre intra-folliculaire divisé en deux groupes de patientes ayant des valeurs basses (inférieures au seuil de 4.395ng/μL) ou des valeurs hautes (supérieures au seuil de 4.395 ng/μL).

Ces résultats sont présentés dans le Tableau 12. Il n'a pas été mis en évidence de différence significative du bilan de réserve ovarienne (AMH, CFA) entre les deux groupes. Les résultats montrent que les patientes ayant des valeurs d'ADN libre intra-folliculaire élevées ont reçu une dose totale de gonadotrophines significativement plus faible que les patientes ayant des valeurs basses d'ADN libre. En revanche aucune différence n'a été démontrée concernant le nombre d'ovocytes, le taux de maturité ovocytaire, le taux de fécondation en ICSI, le nombre de clivés précoces et d'embryons obtenus, la qualité embryonnaire, la formation des blastocystes et le taux d'embryons utiles. Il en est de même pour le taux de grossesse clinique par transfert.

Variable	ADN libre (seuil = 4.395 ng/μL)	n (total =36)	Médiane [Q1-Q3]	p
AMH (ng/mL)	< seuil	22	6.9 [4.22;9.59]	0.7 NS
	≥ seuil	14	7.43 [5.81;8.82]	
CFA	< seuil	22	24 [20;40]	0.63 NS
	≥ seuil	14	30 [22;35]	
Dose totale gonadotrophines (UI/L)	< seuil	22	1800 [1512;2025]	<b>0.01</b>
	≥ seuil	14	1500 [1008;1625]	
Durée stimulation (j)	< seuil	22	10 [9;11]	0.66 NS
	≥ seuil	14	10 [9;12]	
E2 au déclenchement (pg/mL)	< seuil	22	1716 [1317;2249]	0.46 NS
	≥ seuil	14	2232 [1371;3056]	
Nombre d'ovocytes	< seuil	22	13 [10;15]	0.58 NS
	≥ seuil	14	12 [7;18]	
Taux d'ovocytes matures (ICSI)	< seuil	15	0.75 [0.5;0.95]	0.83 NS
	≥ seuil	13	0.79 [0.71;0.83]	
Taux de fécondation (ICSI)	< seuil	15	0.67 [0.54;0.87]	0.43 NS
	≥ seuil	13	0.79 [0.61;0.89]	
Clivés précoces	< seuil	21	1.5 [0;4.5]	0.3 NS
	≥ seuil	14	2 [1;4]	
Nombre d'embryons J2	< seuil	21	7 [4;9.5]	0.62 NS
	≥ seuil	14	8 [4;11]	
Nombre d'embryons grade 1-2 à J2	< seuil	21	2 [0.5;3.5]	0.16 NS
	≥ seuil	14	4 [2;6]	
Nombre moyen de blastomères par embryon à J3	< seuil	20	7.9 [6.8;8.6]	0.26 NS
	≥ seuil	14	8.5 [7;9.6]	
Embryons J3 avec ≤ 25% de fragments	< seuil	20	5 [2;8]	0.43 NS
	≥ seuil	14	7 [4;10]	
Nombre de blastocystes	< seuil	18	2 [0;3]	0.77 NS
	≥ seuil	9	0.5 [0;4]	
Blastocystes/embryons mis en CP	< seuil	16	0.43 [0.25;0.75]	0.54 NS
	≥ seuil	8	0.5 [0.31;0.71]	
Taux d'embryons utiles	< seuil	19	0.37 [0.28;0.7]	0.6 NS
	≥ seuil	10	0.5 [0.33;0.67]	
Grossesse clinique	< seuil	16	31.25%	0.34 NS
	≥ seuil	10	50%	

**Tableau 12 : comparaison des populations de patientes avec valeurs basses versus valeurs hautes d'ADN libre intra-folliculaire**

# **DISCUSSION**

Nous avons noté dans cette étude une grande variabilité entre les patientes, que l'on retrouve fréquemment dans les études relatives à cette population de femmes avec SOPK. Cette hétérogénéité importante peut expliquer un écart-type élevé : la concentration moyenne en ADN libre dans les LF était de  $8.02 \pm 14.4$  ng/ $\mu$ L, valeur qui semble élevée par rapport aux moyennes précédemment décrites dans la littérature (13,21,116). La médiane était de 2.42 ng/ $\mu$ L. Cette différence avec les études précédentes peut être expliquée en partie par la différence de kit d'extraction utilisé lors de nos dosages. Cependant, Traver et al. (2015) ont montré des taux d'ADN libre significativement plus élevés en cas d'anomalie de la réserve ovarienne (SOPK ou IOP) comparativement aux patientes normo-répondeuses (21).

L'étude du bilan de réserve ovarienne est donc particulièrement intéressante dans la population des patientes avec SOPK. Le CFA fait partie des critères de Rotterdam définissant le syndrome, mais plusieurs auteurs souhaitent voir revus ces critères. En effet, l'amélioration des techniques échographiques affinant et augmentant ainsi le compte des follicules antraux et la place désormais incontournable de l'AMH comme marqueur de la réserve ovarienne mènent ces auteurs à proposer de nouveaux critères de définition de l'ovaire polykystique morphologique (31,118). Certains travaux ont proposé un seuil à 5 ng/mL pour son intégration dans la définition (32), seuil que nous avons choisi pour cette variable dans notre étude. Un avis de la HAS (Haute Autorité de Santé) sur l'évaluation de la pertinence du dosage de l'AMH en vue de son inscription à la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale a été rendu en juillet 2017 (119). Cet avis n'a cependant pas validé de valeur seuil d'AMH pour caractériser les ovaires polykystiques morphologiques dans le cadre du diagnostic du SOPK, montrant la complexité d'établir des consensus pour cette pathologie.

Le dosage de l'ADN libre pourrait présenter un intérêt pour affiner le diagnostic, par exemple en cas de discordance dans le bilan de réserve ovarienne entre le CFA et le taux d'AMH. Ce marqueur pourrait alors compléter le panel des éléments concourant au diagnostic du SOPK et aider à nuancer les différents phénotypes du syndrome déjà décrits (31).

Pour étudier le lien entre l'ADN libre intra-folliculaire et le SOPK, nous avons choisi deux approches. Premièrement, l'étude de différentes variables portant sur les données cliniques, les paramètres de stimulation, et les critères de qualité embryonnaire. L'étude des données cliniques a montré que les patientes ayant un ratio LH/FSH supérieur à 2 avaient des taux d'ADN libre intra-folliculaires significativement plus élevés que les patientes avec un ratio

inférieur. L'élévation du taux de LH est très fréquente chez les patientes avec SOPK et impliquée dans sa physiopathologie. Elle est associée à une diminution relative de la FSH et donc à une augmentation du ratio LH/FSH, considéré comme un signe d'appel du SOPK bien qu'il ne s'agisse pas d'un critère recommandé pour le diagnostic du syndrome (2). Cette différence pourrait indiquer des taux plus élevés chez les patientes présentant un syndrome plus marqué sur le plan hormonal.

Le surpoids et l'obésité sont très fréquemment décrits chez les patientes avec SOPK (120), dans notre population l'IMC moyen était en effet de  $25.2 \pm 5.4 \text{ kg/m}^2$ . Il n'a cependant pas été constaté de différence significative des taux d'ADN libre entre les groupes définis selon l'IMC. Cependant la petite taille de l'étude appelle à la réserve dans l'interprétation de ces résultats.

L'étude des données de la stimulation ovarienne a montré que les patientes pour lesquelles la dose totale de gonadotrophines utilisée au cours de la stimulation était la plus faible ( $\leq 1500 \text{ UI/L}$ ) présentaient des taux d'ADN libre intra-folliculaires significativement plus élevés que les patientes ayant reçu des doses plus importantes. Ce même résultat a été montré lorsque la dose initiale de gonadotrophine était la plus faible ( $\leq 150 \text{ UI/L}$ ), et il n'a pas été mis en évidence de différence significative en fonction de la durée de stimulation. Ce constat semble étonnant : les travaux précédents ont montré des taux d'ADN libre plus élevés chez les patientes ayant reçu de fortes doses au cours de la stimulation ou des stimulations de longue durée (21). De plus, les doses élevées de gonadotrophines administrées entraîneraient une augmentation de l'apoptose des cellules du cumulus dans les follicules (121). Le choix de la dose de départ de gonadotrophine est établi en fonction du bilan de réserve ovarienne (CFA, AMH), du contexte clinique et de l'IMC de la patiente. Les femmes avec SOPK ayant reçu les plus faibles doses de gonadotrophines sont donc possiblement celles ayant les plus fortes réserves ovariennes et donc un syndrome plus marqué. Cela pourrait expliquer les taux élevés d'ADN libre constatés, que l'on n'explique pas dans ce cas par l'effet de la stimulation hormonale. Ces résultats sont cependant à interpréter avec une grande prudence en raison du faible nombre de patientes de notre série et de la grande hétérogénéité phénotypique entre les patientes avec SOPK, avec une réponse variable à la stimulation.

Concernant les premières étapes du développement embryonnaire, les patientes ayant eu un nombre et un ratio de clivages précoces plus important ont présenté des taux d'ADN libre

plus élevés. Ce résultat semble surprenant et peu interprétable, et n'a pas été associé à d'autres différences significatives concernant le nombre et la maturité des ovocytes. L'étude de la suite du développement a montré en revanche que les patientes ayant le moins d'embryons de bonne qualité (grade 1-2) à J2 présentaient des taux d'ADN libre significativement plus élevés. Ce résultat semble concordant avec les travaux précédents ayant montré que les taux élevés d'ADN libre intra-folliculaires étaient significativement associés à une mauvaise qualité embryonnaire à J2 et à J3 (13,21). En revanche nous n'avons pas retrouvé cette différence significative concernant le ratio des embryons grade 1-2 à J2 par rapport au nombre total d'embryons.

Deuxièmement, nous avons comparé les deux groupes de patientes discriminées par le seuil d'ADN libre établi à partir de la courbe ROC selon la sensibilité et la spécificité à prédire la grossesse. L'aspect de la courbe ROC ainsi que les valeurs de sensibilité et de spécificité appellent là encore à la réserve dans l'interprétation des résultats qui en sont issus. La comparaison des patientes présentant des valeurs hautes d'ADN libre intra-folliculaire par rapport à celles présentant des valeurs basses n'a pas montré de différence significative du bilan de réserve ovarienne (CFA, AMH), des critères de nombre et de maturité des ovocytes, ni de qualité embryonnaire y compris le nombre de blastocystes et le taux de blastulation. En revanche, la dose totale de gonadotrophines utilisée était retrouvée significativement plus faible dans le groupe des patientes présentant un taux d'ADN libre élevé, rejoignant nos résultats précédents.

Ces résultats sont alors à pondérer et peuvent s'expliquer par une population insuffisante dans notre étude, rendant difficile l'analyse statistique en raison de trop petits échantillons pour certaines comparaisons. Il existe également des biais, comme la présence éventuelle d'un facteur masculin pouvant influencer sur la fécondation et la qualité embryonnaire. Nous n'avons cependant pas constaté de taux d'ADN libre significativement différents entre les groupes de patientes prises en charge en FIVc ou en FIV-ICSI. Il existe également un biais technique puisque notre étape pré-analytique de pool des liquides folliculaires ne permet pas de savoir combien de follicules sont évalués lors de l'analyse. De plus, l'interprétation des résultats au-delà de J3 est à relativiser en raison de la fréquence des transferts précoces à J2 ou le plus souvent à J3. Les embryons qui présentent la meilleure qualité à ce stade sont sélectionnés pour le transfert et ne sont donc pas mis en culture prolongée. Ceux-ci ne sont donc pas toujours les embryons ayant la meilleure cinétique d'évolution et les meilleures

caractéristiques morphologiques de la cohorte initiale. Le recrutement effectué sur deux périodes distinctes est à l'origine de l'utilisation de deux kits d'extraction différents, une réserve est donc à émettre sur la comparaison des résultats.

Une étude à plus large échelle de type cas-témoins permettrait de conforter et de compléter les résultats obtenus.

Nos résultats semblent indiquer que les taux élevés d'ADN libre constatés chez les patientes avec SOPK soient liés au statut de la réserve ovarienne et au syndrome en lui-même, plus ou moins marqué sur le plan clinique et biologique. Ce constat est à relier à la physiopathologie du syndrome.

En effet, le SOPK est associé à une anomalie de la maturation folliculaire conduisant à la présence d'un nombre élevé de petits follicules pré-antraux (38). Or les travaux de Scalici et al. (2014) ont démontré une augmentation significative des taux d'ADN libre dans les follicules de petite taille comparés aux follicules de grande taille (13). Selon cette observation, les patientes avec SOPK pourraient donc avoir de plus forts taux d'ADN libre intra-folliculaires en raison de ces nombreux petits follicules.

Une autre étude a démontré chez le rat que des taux élevés d'insuline plasmatique pouvaient favoriser l'apoptose des cellules de la granulosa (122). L'hyperinsulinémie, très fréquemment associée au SOPK (29), pourrait donc contribuer à un accroissement des phénomènes d'apoptose dans les follicules. Les cellules de la granulosa pourraient d'ailleurs être impliquées dans la physiopathologie du syndrome, certains gènes semblant être exprimés différemment dans ces cellules entre des patientes avec SOPK et des patientes témoins (123), dont celui de l'IGF-R3 (Insuline Like Growth Factor Receptor 3) qui semble plus exprimé chez les patientes avec SOPK (124). Une récente étude a non seulement confirmé les précédents résultats en montrant que des taux élevés d'ADN libre étaient associés à une diminution de la qualité embryonnaire et du taux de grossesse ; mais aussi prouvé qu'ils induisaient une apoptose accrue des cellules de la granulosa et une augmentation des radicaux libres dans le LF (116). L'ADN libre intra-folliculaire semble donc être un marqueur intéressant de stress ovarien. Une étude récente a montré le lien entre stress oxydatif et SOPK au cours de la prise en charge en AMP (125).

Nous avons confirmé par cette étude la présence de taux élevés d'ADN libre intra-folliculaires chez les patientes avec SOPK, significativement associés à un ratio LH/FSH élevé et inversement corrélés aux doses de gonadotrophines utilisées. Ces taux sont donc à

relier probablement à la physiopathologie ainsi qu'à la sévérité clinique et biologique du syndrome en lui-même plutôt qu'à l'impact de la stimulation. Nous avons également montré une association significative avec une mauvaise qualité embryonnaire à J2, déjà démontrée par les précédentes études.

# **CONCLUSION**

Le SOPK reste à l'heure actuelle une pathologie complexe, qui impacte les fonctions reproductrices et métaboliques. L'hypothèse fréquente d'une qualité ovocytaire et embryonnaire altérée chez les patientes qui en sont atteintes n'a pas été étayée par notre revue de la littérature (126). En effet, nous ne montrons pas de différence probante que ce soit en termes de morphologie ovocytaire, de qualité ovocytaire ou embryonnaire ou même d'issues des tentatives (4,47,126). Néanmoins, la prise en charge de l'infertilité de ces patientes demeure difficile.

Les taux élevés d'ADN libre intra-folliculaire déjà décrits dans cette population semblent être confirmés par nos résultats (21). Ce marqueur s'inscrit dans le panel des acides nucléiques circulants, dont l'intérêt dans la prise en charge de l'infertilité a été démontré (87). L'ADN libre intra-folliculaire pourrait alors représenter un marqueur non-invasif complémentaire aux critères morphologiques actuels pour évaluer la qualité ovocytaire et embryonnaire, dans des cohortes parfois conséquentes chez ces patientes avec SOPK. Il peut également s'inscrire comme biomarqueur dans le panel des éléments qui concourent au diagnostic du SOPK, lors d'une difficulté diagnostique ou en cas de discordance entre le CFA et l'AMH.

Enfin, nous avons montré que l'évaluation de l'ADN libre intra-folliculaire conduit à une meilleure compréhension de la physiopathologie du SOPK, complexe et multifactorielle (2).

Les acides nucléiques circulants dont l'ADN libre intra-folliculaire constituent donc des biomarqueurs d'intérêt en reproduction humaine (89), dans une évolution vers une prise en charge personnalisée et adaptée à chaque patiente.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol.* 1 janv 1935;29(2):181-91.
2. Balen A. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome: trying to understand PCOS and its endocrinology. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 1 oct 2004;18(5):685-706.
3. Wickenheisser JK, Quinn PG, Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, McAllister JM. Differential Activity of the Cytochrome P450 17 $\alpha$ -Hydroxylase and Steroidogenic Acute Regulatory Protein Gene Promoters in Normal and Polycystic Ovary Syndrome Theca Cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 juin 2000;85(6):2304-11.
4. Heijnen EMEW, Eijkemans MJC, Hughes EG, Laven JSE, Macklon NS, Fauser BCJM. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update.* 1 janv 2006;12(1):13-21.
5. Aydiner F, Yetkin CE, Seli E. Perspectives on emerging biomarkers for non-invasive assessment of embryo viability in assisted reproduction. *Curr Mol Med.* mars 2010;10(2):206-15.
6. Revelli A, Piane LD, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol.* 4 mai 2009;7(1):40.
7. Marteil G, Richard-Parpaillon L, Kubiak JZ. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reprod Biol.* 1 nov 2009;9(3):203-24.
8. Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *MHR Basic Sci Reprod Med.* 1 août 2010;16(8):531-8.
9. Baka S, Malamitsi-Puchner A. Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reprod Biomed Online.* 1 janv 2006;12(4):500-6.
10. Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, et al. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod.* 1 avr 2002;17(4):1017-22.
11. Chen F, Spiessens C, D'Hooghe T, Peeraer K, Carpentier S. Follicular fluid biomarkers for human in vitro fertilization outcome: Proof of principle. *Proteome Sci* [Internet]. 14 nov 2016;14. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5109724/>
12. Katz-Jaffe MG, Gardner DK, Schoolcraft WB. Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *Fertil Steril.* 1 janv 2006;85(1):101-7.
13. Scalici E, Traver S, Molinari N, Mullet T, Monforte M, Vintejou E, et al. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. *Hum Reprod.* 1 déc 2014;29(12):2661-9.
14. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta.* 23 sept 2013;424:222-30.
15. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA. *Clin Chim Acta.* 1 nov 2001;313(1):139-42.
16. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* juin 2011;11(6):426-37.
17. Oellerich M, Schütz E, Beck J, Kanzow P, Plowman PN, Weiss GJ, et al. Using circulating cell-free DNA to monitor personalized cancer therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 3

avr 2017;54(3):205-18.

18. Traver S, Assou S, Scalici E, Haouzi D, Al-Edani T, Belloc S, et al. Cell-free nucleic acids as non-invasive biomarkers of gynecological cancers, ovarian, endometrial and obstetric disorders and fetal aneuploidy. *Hum Reprod Update*. 1 nov 2014;20(6):905-23.
19. Czamanski-Cohen J, Sarid O, Cwikel J, Lunenfeld E, Douvdevani A, Levitas E, et al. Increased plasma cell-free DNA is associated with low pregnancy rates among women undergoing IVF–embryo transfer. *Reprod Biomed Online*. 1 janv 2013;26(1):36-41.
20. Stigliani S, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Hum Reprod*. 1 oct 2013;28(10):2652-60.
21. Traver S, Scalici E, Mullet T, Molinari N, Vincens C, Anahory T, et al. Cell-free DNA in Human Follicular Microenvironment: New Prognostic Biomarker to Predict in vitro Fertilization Outcomes. *PLoS ONE* [Internet]. 19 août 2015 [cité 8 août 2017];10(8). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4545729/>
22. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 1 janv 2004;81(1):19-25.
23. Johnson T, Kaplan L, Ouyang P, Rizza R. National Institutes of Health evidence-based methodology workshop on polycystic ovary syndrome (PCOS). *NIH EbMW Rep*. 2013;1-14.
24. Sirmans SM, Pate KA. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Epidemiol*. 18 déc 2013;6:1-13.
25. Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the Polycystic Ovary Syndrome in Unselected Black and White Women of the Southeastern United States: A Prospective Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 sept 1998;83(9):3078-82.
26. Gordon P, Treasure JL, King EA, Wheeler M, Russell GFM. Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *Br Med J Clin Res Ed*. 11 oct 1986;293(6552):956.
27. Hart R, Hickey M, Franks S. Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 1 oct 2004;18(5):671-83.
28. Hull MG. Epidemiology of infertility and polycystic ovarian disease: endocrinological and demographic studies. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. sept 1987;1(3):235-45.
29. Pauli JM, Raja-Khan N, Wu X, Legro RS. Current perspectives of insulin resistance and polycystic ovary syndrome. *Diabet Med*. 1 déc 2011;28(12):1445-54.
30. Cardozo E, Pavone ME, Hirshfeld-Cytron JE. Metabolic syndrome and oocyte quality. *Trends Endocrinol Metab*. 1 mars 2011;22(3):103-9.
31. Dewailly D. Diagnostic criteria for PCOS: Is there a need for a rethink? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 1 nov 2016;37:5-11.
32. Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P, et al. Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Hum Reprod*. 1 nov 2011;26(11):3123-9.
33. Franks S, McCarthy MI, Hardy K. Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *Int J Androl*. 1 févr 2006;29(1):278-85.
34. Goodarzi MO, Azziz R. Diagnosis, epidemiology, and genetics of the polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 1 juin 2006;20(2):193-205.
35. Franks S, Gharani N, McCarthy M. Candidate genes in polycystic ovary syndrome.

Hum Reprod Update. 1 juill 2001;7(4):405-10.

36. Waldstreicher J, Santoro NF, Hall JE, Filicori M, Crowley WF. Hyperfunction of the Hypothalamic-Pituitary Axis in Women with Polycystic Ovarian Disease: Indirect Evidence for Partial Gonadotroph Desensitization. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 janv 1988;66(1):165-72.
37. Azziz R. Androgen excess is the key element in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 1 août 2003;80(2):252-4.
38. Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update.* 1 juill 2008;14(4):367-78.
39. Sermondade N, Dupont C, Massart P, Cédric-Durnerin I, Lévy R, Sifer C. Influence du syndrome des ovaires polykystiques sur la qualité ovocytaire et embryonnaire. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 1 janv 2013;41(1):27-30.
40. Sahu B, Ozturk O, Ranierrri M, Serhal P. Comparison of oocyte quality and intracytoplasmic sperm injection outcome in women with isolated polycystic ovaries or polycystic ovarian syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 1 mars 2008;277(3):239-44.
41. Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Chouraqui A, Tesquier A, Serkine AM, et al. Qualité des ovocytes et embryons dans le syndrome des ovaires polykystiques. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 1 avr 2003;31(4):350-4.
42. Kdous M, Chaker A, Zhioua A, Zhioua F. [Oocyte and embryo quality and outcome of ICSI cycles in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) versus normo-ovulatory]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* avr 2009;38(2):133-43.
43. Esinler I, Bayar U, Bozdag G, Yarali H. Outcome of intracytoplasmic sperm injection in patients with polycystic ovary syndrome or isolated polycystic ovaries. *Fertil Steril.* 1 oct 2005;84(4):932-7.
44. Engmann L, Maconochie N, Sladkevicius P, Bekir J, Campbell S, Tan SL. The outcome of in-vitro fertilization treatment in women with sonographic evidence of polycystic ovarian morphology. *Hum Reprod.* 1 janv 1999;14(1):167-71.
45. Ludwig M, Finas DF, Al-Hasani S, Diedrich K, Ortmann O. Oocyte quality and treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection cycles of polycystic ovarian syndrome patients. *Hum Reprod.* 1 févr 1999;14(2):354-8.
46. Kumar P, Nawani N, Malhotra N, Malhotra J, Patil M, Jayakrishnan K, et al. Assisted reproduction in polycystic ovarian disease: A multicentric trial in India. *J Hum Reprod Sci.* 1 janv 2013;6(1):49.
47. Sigala J, Sifer C, Dewailly D, Robin G, Bruyneel A, Ramdane N, et al. Is polycystic ovarian morphology related to a poor oocyte quality after controlled ovarian hyperstimulation for intracytoplasmic sperm injection? Results from a prospective, comparative study. *Fertil Steril.* 1 janv 2015;103(1):112-8.
48. Hwang J-L, Seow K-M, Lin Y-H, Hsieh B-C, Huang L-W, Chen H-J, et al. IVF versus ICSI in sibling oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 1 mai 2005;20(5):1261-5.
49. Provost MP, Acharya KS, Acharya CR, Yeh JS, Steward RG, Eaton JL, et al. Pregnancy outcomes decline with increasing body mass index: analysis of 239,127 fresh autologous in vitro fertilization cycles from the 2008–2010 Society for Assisted Reproductive Technology registry. *Fertil Steril.* 1 mars 2016;105(3):663-9.
50. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Ramzy AM, Amin YM. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 1 déc 1997;68(6):1017-21.
51. Fábregues F, Peñarrubia J, Vidal E, Casals G, Vanrell JA, Balasch J. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome: A self-controlled clinical study.

Fertil Steril. 1 oct 2004;82(4):827-33.

52. Wissing ML, Bjerger MR, Olesen AIG, Hoest T, Mikkelsen AL. Impact of PCOS on early embryo cleavage kinetics. *Reprod Biomed Online*. 1 avr 2014;28(4):508-14.
53. Sundvall L, Kirkegaard K, Ingerslev HJ, Knudsen UB. Unaltered timing of embryo development in women with polycystic ovarian syndrome (PCOS): a time-lapse study. *J Assist Reprod Genet*. juill 2015;32(7):1031-42.
54. Hardy K, Robinson FM, Paraschos T, Wicks R, Franks S, Winston RML. Fertilization and early embryology: Normal development and metabolic activity of preimplantation embryos in vitro from patients with polycystic ovaries. *Hum Reprod*. 1 août 1995;10(8):2125-35.
55. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril*. 1 févr 2011;95(2):520-4.
56. Kollmann M, Martins WP, Lima MLS, Craciunas L, Nastri CO, Richardson A, et al. Strategies for improving outcome of assisted reproduction in women with polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1 déc 2016;48(6):709-18.
57. Porter TF, Scott JR. Evidence-based care of recurrent miscarriage. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 1 févr 2005;19(1):85-101.
58. Rai R, Backos M, Rushworth F, Regan L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage—a reappraisal. *Hum Reprod*. 1 mars 2000;15(3):612-5.
59. Wang JX, Davies MJ, Norman RJ. Polycystic ovarian syndrome and the risk of spontaneous abortion following assisted reproductive technology treatment. *Hum Reprod*. 1 déc 2001;16(12):2606-9.
60. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*. 1 juin 2011;26(6):1270-83.
61. Scalici E, Gala A, Ferrières A, Vincens C, Hamamah S. La morphologie embryonnaire a-t-elle encore un intérêt à l'heure actuelle? *Gynécologie Obstétrique Fertil*. 1 sept 2014;42(9):661-4.
62. Wong KM, Repping S, Mastenbroek S. Limitations of Embryo Selection Methods. *Semin Reprod Med*. mars 2014;32(02):127-33.
63. Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod*. 1 avr 1998;13(4):1003-13.
64. de los Santos MJ, Arroyo G, Busquet A, Calderón G, Cuadros J, Hurtado de Mendoza MV, et al. A multicenter prospective study to assess the effect of early cleavage on embryo quality, implantation, and live-birth rate. *Fertil Steril*. 1 avr 2014;101(4):981-7.
65. Wharf E, Dimitrakopoulos A, Khalaf Y, Pickering S. Early embryo development is an indicator of implantation potential. *Reprod Biomed Online*. 1 janv 2004;8(2):212-8.
66. Vernon M, Stern JE, Ball GD, Wininger D, Mayer J, Racowsky C. Utility of the national embryo morphology data collection by the Society for Assisted Reproductive Technologies (SART): correlation between day-3 morphology grade and live-birth outcome. *Fertil Steril*. 30 juin 2011;95(8):2761-3.
67. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 11(3):307-11.
68. Insua MF, Cobo AC, Larreategui Z, Ferrando M, Serra V, Meseguer M. Obstetric and perinatal outcomes of pregnancies conceived with embryos cultured in a time-lapse monitoring system. *Fertil Steril*. 1 sept 2017;108(3):498-504.
69. Zollner U, Dietl J. Perinatal risks after IVF and ICSI. *J Perinat Med*. 2012;41(1):17-

22.

70. Zimmerman RS, Jalas C, Tao X, Fedick AM, Kim JG, Pepe RJ, et al. Development and validation of concurrent preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders and comprehensive chromosomal aneuploidy screening without whole genome amplification. *Fertil Steril*. 1 févr 2016;105(2):286-94.

71. Assou S, Haouzi D, Mahmoud K, Aouacheria A, Guillemin Y, Pantesco V, et al. A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *MHR Basic Sci Reprod Med*. 1 déc 2008;14(12):711-9.

72. Montfoort V, P.a A, Geraedts JPM, Dumoulin JCM, Stassen APM, Evers JLH, et al. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. *MHR Basic Sci Reprod Med*. 1 mars 2008;14(3):157-68.

73. ASSIDI M, MONTAG M, SIRARD M-A. Use of Both Cumulus Cells' Transcriptomic Markers and Zona Pellucida Birefringence to Select Developmentally Competent Oocytes in Human Assisted Reproductive Technologies. *BMC Genomics*. 15 janv 2015;16(Suppl 1):S9.

74. Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil Steril*. 15 mars 2013;99(4):979-97.

75. Seli E, Vergouw CG, Morita H, Botros L, Roos P, Lambalk CB, et al. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril*. 1 juill 2010;94(2):535-42.

76. Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. *Biol Reprod*. 1 juin 2010;82(6):1021-9.

77. Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update*. 1 janv 2003;9(1):35-48.

78. Ambekar AS, Kelkar DS, Pinto SM, Sharma R, Hinduja I, Zaveri K, et al. Proteomics of Follicular Fluid From Women With Polycystic Ovary Syndrome Suggests Molecular Defects in Follicular Development. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 févr 2015;100(2):744-53.

79. Choi B-C, Kim Y-S, Kim M-S, Chung M-K, Choi C-H, Baek K-H. Identification of overexpressed proteins by proteomic analysis using human follicular fluids derived from polycystic ovary syndrome (PCOS) patients. *Fertil Steril*. 1 sept 2007;88:S180.

80. Dai G, Lu G. Different protein expression patterns associated with polycystic ovary syndrome in human follicular fluid during controlled ovarian hyperstimulation. *Reprod Fertil Dev*. 18 sept 2012;24(7):893-904.

81. Angelucci S, Ciavardelli D, Di Giuseppe F, Eleuterio E, Sulpizio M, Tiboni GM, et al. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics*. 1 nov 2006;1764(11):1775-85.

82. Schweigert FJ, Gericke B, Wolfram W, Kaisers U, Dudenhausen JW. Peptide and protein profiles in serum and follicular fluid of women undergoing IVF. *Hum Reprod*. 1 nov 2006;21(11):2960-8.

83. Borowiecka M, Wojsiat J, Polac I, Radwan M, Radwan P, Zbikowska HM. Oxidative stress markers in follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Syst Biol Reprod Med*. 1 déc 2012;58(6):301-5.

84. Placido GD, Alviggi C, Clarizia R, Mollo A, Alviggi E, Strina I, et al. Intra-follicular leptin concentration as a predictive factor for in vitro oocyte fertilization in assisted reproductive techniques. *J Endocrinol Invest*. 1 sept 2006;29(8):719-26.

85. Chang C-L, Wang T-H, Horng S-G, Wu H-M, Wang H-S, Soong Y-K. The concentration of inhibin B in follicular fluid: relation to oocyte maturation and embryo

- development. *Hum Reprod.* 1 juill 2002;17(7):1724-8.
86. Yanaihara A, Mitsukawa K, Iwasaki S, Otsuki K, Kawamura T, Okai T. High concentrations of lactoferrin in the follicular fluid correlate with embryo quality during in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 1 févr 2007;87(2):279-82.
  87. Scalici E, Mullet T, Ferrières Hoa A, Gala A, Loup V, Anahory T, et al. Les acides nucléiques circulants et infertilité. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 1 sept 2015;43(9):593-8.
  88. Mandel P, Metais P. [Not Available]. *C R Seances Soc Biol Fil.* févr 1948;142(3-4):241-3.
  89. Scalici E, Traver S, Mullet T, Ferrières A, Monforte M, Vintejou E, et al. Acides nucléiques circulants et fécondation in vitro. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 1 oct 2014;42(10):696-701.
  90. Vandewoestyne M, Van Hoofstat D, Franssen A, Van Nieuwerburgh F, Deforce D. Presence and potential of cell free DNA in different types of forensic samples. *Forensic Sci Int Genet.* 1 févr 2013;7(2):316-20.
  91. Quinones I, Daniel B. Cell free DNA as a component of forensic evidence recovered from touched surfaces. *Forensic Sci Int Genet.* 1 janv 2012;6(1):26-30.
  92. Sharma VK, Vouros P, Glick J. Mass spectrometric based analysis, characterization and applications of circulating cell free DNA isolated from human body fluids. *Int J Mass Spectrom.* juill 2011;304(2-3):172-83.
  93. Soltani M, Nemati M, Maralani M, Estiar MA, Andalib S, Fardiazar Z, et al. Cell-free fetal DNA in amniotic fluid supernatant for prenatal diagnosis. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr.* 30 avr 2016;62(4):14-7.
  94. Costa F, Barbisan F, Assmann CE, Araújo NKF, Oliveira AR de, Signori JP, et al. Seminal cell-free DNA levels measured by PicoGreen fluorochrome are associated with sperm fertility criteria. *Zygote.* avr 2017;25(2):111-9.
  95. Pisetsky DS, Fairhurst A-M. The origin of extracellular DNA during the clearance of dead and dying cells. *Autoimmunity.* 1 janv 2007;40(4):281-4.
  96. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* mars 2014;11(3):145-56.
  97. Gahan PB, Anker P, Stroun M. Metabolic DNA as the Origin of Spontaneously Released DNA? *Ann N Y Acad Sci.* 1 août 2008;1137(1):7-17.
  98. Jylhävä J, Nevalainen T, Marttila S, Jylhä M, Hervonen A, Hurme M. Characterization of the role of distinct plasma cell-free DNA species in age-associated inflammation and frailty. *Aging Cell.* 1 juin 2013;12(3):388-97.
  99. Truszczyńska A, Foronczewicz B, Pączek L. The role and diagnostic value of cell-free DNA in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2017;35(2):330-6.
  100. Bianchi DW. Circulating Fetal DNA: Its Origin and Diagnostic Potential—A Review. *Placenta.* 1 avr 2004;25(Supplement):S93-101.
  101. Clementi A, Virzì GM, Brocca A, Pastori S, Cal M de, Marcante S, et al. The Role of Cell-Free Plasma DNA in Critically Ill Patients with Sepsis. *Blood Purif.* 2016;41(1-3):34-40.
  102. Cui M, Fan M, Jing R, Wang H, Qin J, Sheng H, et al. Cell-Free Circulating DNA: A New Biomarker for the Acute Coronary Syndrome. *Cardiology.* 2013;124(2):76-84.
  103. Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1 juin 1987;23(6):707-12.
  104. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, et al. Increased Integrity of Free Circulating DNA in Sera of Patients with Colorectal or Periampullary

- Cancer: Direct Quantitative PCR for ALU Repeats. *Clin Chem*. 1 juin 2006;52(6):1062-9.
105. Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY. Circulating Nucleic Acids as a Potential Source for Cancer Biomarkers. *Curr Mol Med*. 1 mars 2010;10(2):142-65.
106. Hao TB, Shi W, Shen XJ, Qi J, Wu XH, Wu Y, et al. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 14 oct 2014;111(8):1482-9.
107. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch R-D, et al. DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Res*. 2 févr 2001;61(4):1659-65.
108. Kamat AA, Bischoff FZ, Dang D, Baldwin M, Han LY, Lin YG, et al. Circulating cell-free DNA: A novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma. *Cancer Biol Ther*. 11 oct 2006;5(10):1369-74.
109. Madhavan D, Wallwiener M, Bents K, Zucknick M, Nees J, Schott S, et al. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. *Breast Cancer Res Treat*. 1 juill 2014;146(1):163-74.
110. Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update*. 1 janv 2005;11(1):59-67.
111. Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yuan Y, Guo Y, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1 mai 2015;45(5):530-8.
112. Miura K, Higashijima A, Shimada T, Miura S, Yamasaki K, Abe S, et al. Clinical application of fetal sex determination using cell-free fetal DNA in pregnant carriers of X-linked genetic disorders. *J Hum Genet*. avr 2011;56(4):296-9.
113. Haute Autorité de Santé - Place des tests ADN libre circulant dans le sang maternel dans le dépistage de la trisomie 21 foetale [Internet]. [cité 8 oct 2017]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_2768510/fr/place-des-tests-adn-libre-circulant-dans-le-sang-maternel-dans-le-depistage-de-la-trisomie-21-foetale](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2768510/fr/place-des-tests-adn-libre-circulant-dans-le-sang-maternel-dans-le-depistage-de-la-trisomie-21-foetale)
114. Vital VR, Téllez SV, Hinojosa JC, Reyes AF. [Ovarian apoptosis]. *Ginecol Obstet Mex*. mars 2001;69:101-7.
115. Sadraie SH, Saito H, Kaneko T, Saito T, Hiroi M. Effects of Aging on Ovarian Fecundity in Terms of the Incidence of Apoptotic Granulosa Cells. *J Assist Reprod Genet*. mars 2000;17(3):168-73.
116. Guan Y, Zhang W, Wang X, Cai P, Jia Q, Zhao W. Cell-free DNA induced apoptosis of granulosa cells by oxidative stress. *Clin Chim Acta* [Internet]. 21 nov 2016 [cité 8 août 2017]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898116304685>
117. Stigliani S, Persico L, Lagazio C, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome. *MHR Basic Sci Reprod Med*. 1 déc 2014;20(12):1238-46.
118. Lie Fong S, Laven JSE, Duhamel A, Dewailly D. Polycystic ovarian morphology and the diagnosis of polycystic ovary syndrome: redefining threshold levels for follicle count and serum anti-Müllerian hormone using cluster analysis. *Hum Reprod*. 1 août 2017;32(8):1723-31.
119. Haute Autorité de Santé - Évaluation du dosage sérique de l'hormone anti-müllérienne [Internet]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_2749006/fr/evaluation-du-dosage-serique-de-l-hormone-anti-mullerienne](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2749006/fr/evaluation-du-dosage-serique-de-l-hormone-anti-mullerienne)
120. Ehrmann DA. Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med*. 24 mars 2005;352(12):1223-36.

121. Liu S, Feng HL, Marchesi D, Chen Z-J, Hershlag A. Dose-dependent effects of gonadotropin on oocyte developmental competence and apoptosis. *Reprod Fertil Dev.* 3 nov 2011;23(8):990-6.
122. Ni X-R, Sun Z-J, Hu G-H, Wang R-H. High Concentration of Insulin Promotes Apoptosis of Primary Cultured Rat Ovarian Granulosa Cells Via Its Increase in Extracellular HMGB1. *Reprod Sci.* 1 mars 2015;22(3):271-7.
123. Wissing ML, Sonne SB, Westergaard D, Nguyen K do, Belling K, Høst T, et al. The transcriptome of corona radiata cells from individual MII oocytes that after ICSI developed to embryos selected for transfer: PCOS women compared to healthy women. *J Ovarian Res* [Internet]. 29 nov 2014 [cité 17 août 2017];7. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4302704/>
124. Kwon H, Choi D-H, Bae J-H, Kim J-H, Kim Y-S. mRNA expression pattern of insulin-like growth factor components of granulosa cells and cumulus cells in women with and without polycystic ovary syndrome according to oocyte maturity. *Fertil Steril.* 1 nov 2010;94(6):2417-20.
125. Melo AS de, Rodrigues JK, Junior AAJ, Ferriani RA, Navarro PA. Oxidative stress and polycystic ovary syndrome: an evaluation during ovarian stimulation for intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction.* 1 janv 2017;153(1):97-105.
126. Fournier A, Torre A, Delaroche L, Gala A, Mullet T, Ferrières A, et al. Qualité ovocytaire et embryonnaire chez les femmes avec syndrome des ovaires polykystiques : état de l'art. *Gynécologie Obstétrique Fertil Sénologie.* 1 juill 2017;45(7):429-38.

## SERMENT DE GALIEN

*Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :*

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.*

# RÉSUMÉ

**Introduction** : Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) est une pathologie complexe, multifactorielle et fréquente. La prise en charge de l'infertilité des patientes qui en sont atteintes est un enjeu majeur.

**Objectif de l'étude** : Evaluer le dosage de l'ADN libre dans le liquide folliculaire des patientes présentant un SOPK comme biomarqueur non-invasif prédictif de la qualité embryonnaire.

**Données de la littérature** : L'ADN libre, constitué de petits fragments d'ADN double brin, est utilisé comme biomarqueur diagnostique et pronostique en Santé Humaine. En Reproduction, les taux élevés d'ADN libre ont été associés à une mauvaise qualité embryonnaire et à une diminution des taux de grossesse après FIV.

**Matériels et méthodes** : Il s'agit d'une étude prospective monocentrique réalisée au CHU de Montpellier. 36 patientes porteuses d'un SOPK défini selon les critères de Rotterdam et bénéficiant d'une prise en charge en FIV ont été incluses. Les liquides folliculaires d'une même patiente ont été poolés, centrifugés puis congelés, et l'ADN libre y a été quantifié par ALUqPCR.

**Résultats** : Nous avons constaté des taux élevés d'ADN libre intra-folliculaire. Ces taux sont significativement plus élevés chez les patientes ayant reçu de faibles doses de gonadotrophines au cours de la stimulation, et lorsque le ratio LH/FSH est supérieur à 2. Ils sont également significativement associés à une diminution du nombre d'embryons de grade 1-2 à J2.

**Conclusion** : Les taux d'ADN libre intra-folliculaire semblent plus impactés par les caractéristiques cliniques et biologiques du SOPK que par la stimulation ovarienne. Ils sont un marqueur de stress ovarien et contribuent à la compréhension de la physiopathologie du syndrome. Le dosage de l'ADN libre intra-folliculaire est un marqueur complémentaire d'évaluation de la qualité ovocytaire et embryonnaire, et peut concourir au diagnostic du syndrome. Il s'inscrit ainsi dans le panel des acides nucléiques circulants, qui ont montré leur intérêt dans la prise en charge individualisée de l'infertilité.