



L'essentiel de l'information  
scientifique et médicale

[www.jle.com](http://www.jle.com)

Le sommaire de ce numéro

<http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/medecine/mtg/sommaire.md?type=text.html>



**Montrouge, le 09/06/2014**

Nathalie Lédée

**Vous trouverez ci-après le tiré à part de votre article au format électronique (pdf) :**

Préparer l'endomètre à l'implantation embryonnaire en adaptant les traitements au profil immunologique endométrial de la patiente

**paru dans**

Médecine de la Reproduction, 2014, Volume 16, Numéro 2

**John Libbey Eurotext**

*Ce tiré à part numérique vous est délivré pour votre propre usage et ne peut être transmis à des tiers qu'à des fins de recherches personnelles ou scientifiques. En aucun cas, il ne doit faire l'objet d'une distribution ou d'une utilisation promotionnelle, commerciale ou publicitaire.*

*Tous droits de reproduction, d'adaptation, de traduction et de diffusion réservés pour tous pays.*

© John Libbey Eurotext, 2014

# Préparer l'endomètre à l'implantation embryonnaire en adaptant les traitements au profil immunologique endométrial de la patiente

Preparing the endometrium for an optimal implantation through a personalization of treatments based on each patient's immune endometrial profile

Nathalie Lédée<sup>1,3,4</sup>  
 Marie Petitbarat<sup>1,3</sup>  
 Katia Vezmar<sup>1,3</sup>  
 Dominique Vitoux<sup>2</sup>  
 Mona Rahmati<sup>1,3,4</sup>  
 Armand Bensussan<sup>3</sup>  
 Gérard Chaouat<sup>3</sup>  
 Richard Balet<sup>4</sup>

<sup>1</sup> MatriceLAB Innove, Hôpital Saint-Louis, Pavillon Bazin, Paris, France

<sup>2</sup> Plateforme de diagnostic biologique automatisé, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

<sup>3</sup> UMRS-976, Université Paris-Diderot, Hôpital Saint-Louis, Pavillon Bazin, Paris, France

<sup>4</sup> Centre de PMA de l'hôpital des Bluets, Paris, France



Tirés à part : N. Lédée

**Résumé.** Chez l'homme, le taux d'implantation moyen d'un embryon obtenu après FIV/ICSI se situe aux alentours de 15 à 20 %. On estime qu'environ la moitié des patientes infertiles traitées sont concernées partiellement ou totalement par un problème de réceptivité utérine conjoint et se trouvent en échec d'implantation malgré le transfert correct d'embryons de qualité. Jusqu'à présent, la réceptivité utérine au sens d'une évaluation biologique de l'aptitude immunologique maternelle à recevoir un embryon ne fait pas partie de la démarche diagnostique courante pour optimiser les chances d'implantation. L'objectif de cet article va être de décrire les bases physiologiques et le rationnel de l'approche innovante développée par la société de recherche et d'innovation médicale MatriceLAB Innove afin de permettre une optimisation de la réceptivité utérine. Au terme de 10 ans de recherche fondamentale, il semble possible de proposer une approche pratique, clinique et innovante issue de la recherche sur la réceptivité utérine afin d'optimiser la prise en charge des patientes en fécondation *in vitro*. La première partie de cette revue reprendra les bases physiologiques et immunologiques gouvernant la réceptivité utérine et l'implantation embryonnaire : rationnel physiologique et immunologique. Cela introduira le rationnel concernant les biomarqueurs que nous utiliserons au cours de ce diagnostic. La seconde partie sera dédiée aux conséquences thérapeutiques et donc à la personnalisation du soin que nous introduisons en cas de profil immunologique perturbé. Enfin, à partir de ces bases, nous illustrerons les résultats cliniques obtenus en 2012-2013 par le centre d'assistance médicale procréative de l'hôpital Pierre-Rouques-Les Bluets (Paris) après personnalisation du soin dans des cas difficiles d'échecs inexpliqués d'implantation embryonnaire.

**Mots clés :** endomètre, FIV/ICSI, grossesse, réceptivité utérine, cytokines, cellules utérines NK

**Abstract.** After IVF/ICSI, the embryo implantation is still the main limiting factor of live birth success. Every ninth couple in Europe and USA is affected by implantation disorders and pregnancy wastage, and the majority of pregnancy losses occur before or during embryo implantation. The first part of the manuscript will review the immune events occurring very specifically within the endometrium at the time of the embryo implantation. A unique immune reaction occurs during the implantation window within the endometrium and is essential 1) to promote embryo adhesion and 2) to regulate the invasion phase. Disequilibrium of such a vital reaction may impede implantation. From such basis, we will explore how assisted reproductive treatments may influence positively or negatively immune local deregulations and possibly may be used to personalize subsequent treatments in order to optimize the uterine receptivity. To illustrate the theory, we will present the results of such personalization in function of the endometrial immune profile in a prospective cohort study with a history of unexplained and repeated embryo implantation failures (RIF) followed in the reproductive unit of the Pierre-Rouques-Les Bluets hospital in 2012-2013. Promoting an adequate and initial dialogue between the embryo and the endometrium at the time of implantation has so far been poorly considered or anticipated in assisted reproductive medicine but may represent an affordable solution to increase live birth rate.

**Key words:** endometrium, IVF/ICSI, pregnancy, receptivity uterine, cytokines, uterine NK cells

Chez l'homme, le coût des techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) est élevé alors que les taux d'infertilité continuent de croître. En 2011, 480 000 cycles de

fécondation *in vitro/intra-cytoplasmic sperm injection* (FIV/ICSI) ont été réalisés en Europe, et la France est leader pour le nombre de cycles réalisés. Entre 2007 à 2010, sur la base de

50 à 60 000 tentatives annuelles de FIV/ICSI en France (rapport de l'Agence de biomédecine), les taux d'accouchements effectifs par transfert d'embryons recensés sont seulement de 23 % après ICSI, et 22 % après FIV. En effet, le taux d'implantation moyen se situe encore aux alentours de 15 à 20 % de grossesses par embryon transféré. On transfère ainsi en France en moyenne 1 à 2 embryons lors des deux premières tentatives, et 2 à 3 embryons lors des deux tentatives suivantes afin d'augmenter les chances de succès.

On estime qu'environ la moitié des patientes infertiles traitées dans un centre sont concernées partiellement ou totalement par un problème de réceptivité utérine conjoint et se trouvent en échec d'implantation malgré le transfert d'embryons dits de bonne qualité. Ces situations outre leur coût économique pour la société, engendrent des situations de détresse psychologique chez les femmes et participent au tourisme médical lucratif vers les centres à l'étranger proposant des dons de gamètes ou d'embryons, voire parfois des tentatives de grossesse pour autrui sur des indications mal définies. Jusqu'à présent, la réceptivité utérine au sens d'une évaluation biologique de l'aptitude immunologique maternelle à recevoir un embryon n'est pas proposée. L'objectif de cet article va être de décrire les bases physiologiques et le rationnel de l'approche innovante développée par MatriceLAB Innove (MLI) pour permettre une optimisation de la réceptivité utérine.

Au terme de dix ans de recherches fondamentales, la start-up Matricelab innove a été créé fin 2011 au sein de l'UMRS-976 Inserm (Université Paris Diderot-Hôpital Saint-Louis), elle-même dédiée à l'étude des mécanismes fondamentaux de l'inflammation et ses liens avec l'immunité innée. L'objectif de la démarche est de proposer des approches pratiques, cliniques et innovantes issues de la recherche sur la réceptivité utérine afin d'optimiser la prise en charge des patientes en FIV. Ce projet est développé en collaboration avec la plate-forme automatisée de diagnostic biologique de l'hôpital Saint-Louis. À partir de ces bases, nous illustrerons les résultats cliniques obtenus en 2012-2013 par le centre d'AMP de l'hôpital Pierre-Rouques-Les Bluets (Paris) après personnalisation du soin dans ces cas difficiles.

## La réceptivité utérine et l'implantation embryonnaire : rationnel physiologique et immunologique

La réussite de l'implantation embryonnaire, tant aux stades d'apposition adhésion qu'à celui de l'invasion primaire, repose sur un tripode que constituent la qualité embryonnaire, la réceptivité utérine et la synchronisation des stades de développement entre ces deux compartiments [1]. Chez la femme, l'utérus présente

une préparation autonome de la muqueuse endométriale et du stroma afin d'accueillir un blastocyste 130 à 140 heures après la fécondation. Sous l'effet de la progestérone produite après l'ovulation, l'endomètre subit des modifications structurales et moléculaires permettant potentiellement à un embryon compétent de s'implanter au cours de cette fenêtre [2]. La fenêtre d'implantation est censée s'ouvrir 4 jours après l'ovulation et se ferme 9 jours après l'ovulation [3]. En dehors de cette fenêtre très précise, l'endomètre est réfractaire à toute implantation et a pour simple mission de défendre l'utérus de toute infection et/ou agression extérieure. L'implantation humaine débute par l'apposition des épithéliums du blastocyste et de l'endomètre suivie de l'adhésion de l'embryon à l'endomètre. Cette phase requiert une réactivité de part et d'autre avec localement la nécessité d'une réaction « pseudo-inflammatoire » transitoire pour permettre cette accroche. Cette phase d'adhésion se poursuit par une phase d'invasion extrêmement profonde de la matrice maternelle par les cellules du trophoblaste allant jusqu'au remplacement des cellules endothéliales des artères spiralées endométriales par le trophoblaste extra-villeux. On compare souvent cette phase à celle d'un envahissement cancéreux extrêmement bien régulé et contrôlé dans l'espace et le temps. Sur un plan immunologique, l'implantation est ainsi comparée à une semi-allogreffe (l'embryon étant génétiquement différent de sa mère) nécessitant la mise en place d'une tolérance immunitaire localisée (figure 1).

Contrairement à la plupart des espèces animales, l'endomètre va subir une décidualisation non déclenchée par la présence de l'embryon, à chaque cycle en préparation à une éventuelle implantation. C'est sur cette base que des explorations endométriales avant conception dans l'espèce humaine sont justifiables. La décidualisation de l'endomètre en phase lutéale moyenne (période de réceptivité utérine), au sens large où nous l'entendons, est ce phénomène post-ovulatoire de remodelage endométrial qui inclut la transformation sécrétoire des glandes, l'arrivée de cellules *Natural Killer* (NK) spécialisées et un remodelage de la paroi des artères spiralées. Au prix de cette différenciation sous contrôle de la progestérone et de l'AMP cyclique, les cellules stromales décidualisées acquièrent la propriété unique de réguler l'invasion trophoblastique, de résister aux agressions du stress oxydatif et enfin de développer un environnement de tolérance immunitaire local et programmé (figure 2).

Plusieurs événements immunologiques fondamentaux vont survenir pendant cette phase de réceptivité utérine.

### Un switch des acteurs immunologiques : de l'immunité adaptative à l'immunité innée

On observe tout d'abord un *switch* quasi complet de toutes les cellules immunocompétentes endométriales

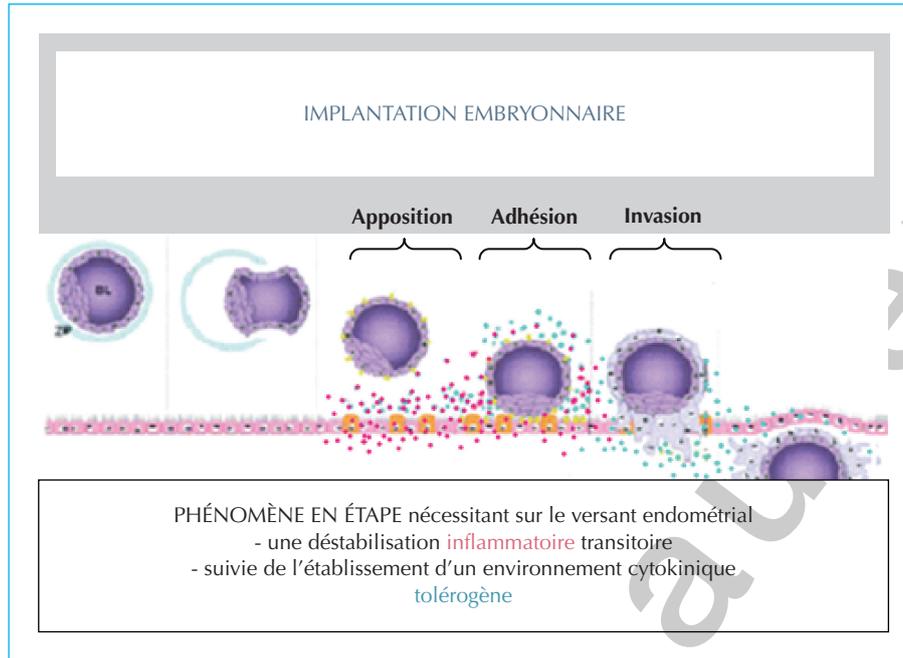


Figure 1. L'implantation embryonnaire.

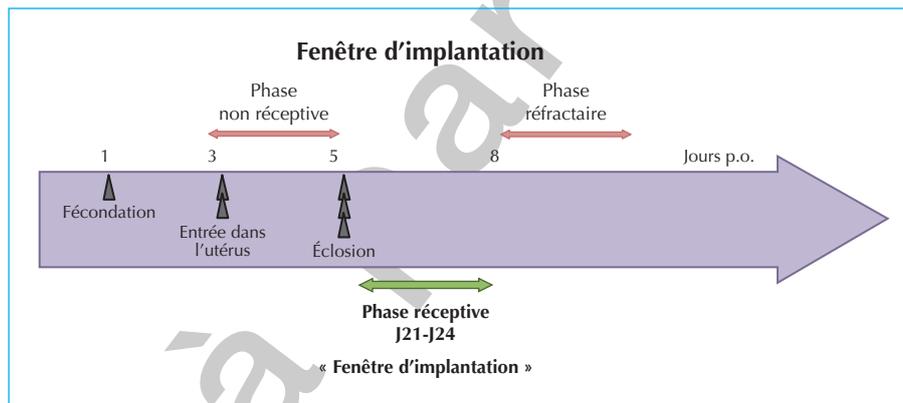


Figure 2. Fenêtre d'implantation.

à cette phase du cycle. Alors qu'en phase proliférative, l'endomètre est envahi de lymphocytes B, de lymphocytes T CD8 visant à défendre l'intégrité de la muqueuse, en fenêtre d'implantation, ces acteurs ont fui pour être remplacés par des acteurs de l'immunité innée, les cellules utérines *Natural Killer* (uNK) notamment, mais aussi les cellules dendritiques et faisant le lien avec les acteurs de l'immunité adaptative, les cellules T-régulatrices. Les travaux de Charlie Loke ont permis de montrer que l'influx en phase lutéale des cellules uNK était un élément constructif, essentiel dans le processus implantatoire contrairement à ce que l'on pensait précédemment [4]. C'est cette mobilisation cellulaire qui permet le dialogue immuno-

phique cellulaire à l'origine du mécanisme de croissance du fœtus grâce notamment à l'établissement d'un réseau vasculaire adapté. Ces présomptions ont été démontrées par la suite par Anne Croy en 2003, puis admises par le monde scientifique [5]. Ces cellules uNK sont particulières dans leur phénotype et dans leur fonction et se distinguent des cellules NK sanguines [6-8]. Très sommairement, les cellules NK sanguines sont la première ligne de défense de l'organisme. Tout ce qui n'est pas soi est tué immédiatement (cellules infectées ou cancéreuses). Leur particularité est liée à leur cytotoxicité aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoire Th-1. Les cellules uNK sont différentes et se caractérisent dans une situation normale

par une sécrétion de cytokines Th-2 dominante à l'origine de l'immunotrophisme (base de la croissance fœtale) et de l'angiogenèse locale permettant un développement adapté du placenta. Cela est à l'origine du concept que la grossesse est un phénomène Th-2. Ce concept a été revisité par la suite pour préciser qu'il s'agit en fait d'un équilibre Th-1/Th-2 tendant vers le profil Th-2 prédominant car l'absence totale de cytokines Th-1 est également délétère [9]. Il faut donc à l'interface materno-embryonnaire un environnement cytokinique équilibré afin de permettre aux cellules immunologiques présentes d'avoir des fonctions normales favorisant l'implantation et la gestation.

Cette réaction biologique immunitaire est nécessaire pour permettre la réactivité locale nécessaire lors de l'apposition et l'adhésion. Elle devient essentielle pour réguler l'invasion des cellules trophoblastiques dans l'endomètre afin de réguler la placentation. La compréhension des clés diagnostiques concernant la réceptivité utérine et plus largement le processus implantatoire ne peut se faire sans prendre en compte les acteurs et les particularités de l'immunité innée. L'endomètre, sa complexité cellulaire, les particularités uniques de l'antigénémie embryonnaire font de l'implantation un phénomène unique du vivant. Le concept de tolérance materno-fœtale est en fait un dialogue materno-fœtal qui s'instaure dès les premiers moments de la vie, l'embryon étant au centre d'une « mer de cytokines ». L'implantation est un équilibre, il est particulier à l'individu et nécessite de ce fait une personnalisation du diagnostic et du soin. Ces cytokines seront à l'origine d'un dialogue continu entre conceptus (embryon et placenta) et le système immunologique maternel [10].

Dans notre approche innovante, nous quantifions l'expression de deux cytokines, l'interleukine (IL)-18 et l'IL-15. Le but de cette quantification est de documenter l'équilibre cytokinique afin de comprendre les fonctions soit positives, soit négatives des cellules immunocompétentes présentes en fenêtre implantatoire.

L'IL-15 est la cytokine à l'origine du recrutement et de la maturation des cellules uNK en fenêtre implantatoire [11] et le système IL-18 est relié au processus angiogénique [12] tout en informant de l'équilibre Th-1/Th-2 local.

L'IL-18 est en effet une cytokine bivalente, c'est-à-dire indispensable à faible dose du fait de son action positive Th-2 stimulant l'angiogenèse locale et la déstabilisation des artères spiralées, mais délétère en excès car devenant Th-1 cytotoxique et pro-apoptotique. L'échec d'implantation peut aussi bien résulter d'un défaut d'expression et/ou de sécrétion Th2 (défaut d'angiogenèse, pas de déstabilisation des artères spiralées pour les rendre envahissables) que d'un excès de sécrétion Th1 [13, 14]. En effet, une sécrétion locale importante et conjuguée d'IL-12 et d'IL-18 entraîne une activation des cellules

uNK en véritables *Killers* (LAKs), qui de fait peut être une limite à l'invasion trophoblastique et être nocive pour l'embryon. À l'inverse, l'absence de sécrétion au niveau de l'endomètre suggère une absence de réactivité de la muqueuse utérine, réactivité pourtant nécessaire au phénomène d'apposition entre les épithéliums embryonnaire et utérin.

Les premières conséquences de ces déséquilibres sont vasculaires et sont souvent dépistables de manière non spécifique par échographie. L'échographie avec angiographie digitalisée, nouvelle méthode non invasive, est la méthode la plus adaptée pour étudier l'angiogenèse endométriale. Nous avons donc combiné une exploration endométriale vasculaire par échographie en trois dimensions avec analyse digitale et une quantification par PCR quantitative de l'expression des ARN messagers de l'IL-15, l'IL-18 et de l'angiopoïétine-2 en fenêtre implantatoire chez des femmes en échec d'implantation et des femmes fertiles [15]. Le groupe fertile, au plan des données échographiques, était remarquable par le peu de variations des index de pulsatilité des artères utérines et du flux vasculaire endométrial. Le groupe en échec est lui hétérogène avec des variations considérables des paramètres, avec des cas d'absence complète de vascularisation endométriale ou à l'inverse d'hypervascularisation locale probablement inflammatoire. Le flux vasculaire endométrial est corrélé à l'expression des ARN messagers de l'IL-15. Cela suggère qu'une absence d'angiogenèse locale peut être la conséquence du non-recrutement local des cellules uNK nécessaires au processus implantatoire. Il existe une corrélation négative entre l'expression des ARN messagers du système IL-18 et l'index de pulsatilité des artères utérines. L'hypothèse ici est que l'absence de sécrétion d'IL-18 entraîne la non-déstabilisation physiologique des artères spiralées, préambule nécessaire pour leur invasion. Nous observons, par le biais de la mesure de l'index de pulsatilité des artères utérines, la conséquence de leur non-remodelage.

À partir de ces bases fondamentales, nous avons conduit depuis 2002 des recherches biomédicales au sein de l'équipe « Implantation et dialogue cytokinique mère-conceptus » hébergée successivement au sein de l'unité Inserm-782 (Paris 11) puis Inserm-976 (université Paris-Diderot) ainsi que dans le cadre du réseau européen d'excellence EMBIC (*EMBryo Implantation Control* - 2004/2008). L'objectif de la démarche était tout d'abord d'identifier les possibles dérégulations immunitaires endométriales afin de comprendre le mécanisme à l'origine de l'échec d'implantation.

Nous avons tout d'abord documenté la présence d'anomalies de mobilisation des cellules uNK (CD56+) dans l'endomètre soit à type de défaut ou d'excès de mobilisation chez des femmes en échecs d'implantation comparées à une cohorte fertile. Nous avons ensuite corrélié ces anomalies de mobilisation de cellules utérines

NK à des anomalies d'expression cytokinique (IL-12, IL-15, IL-18) en immuno-histochimie, puis par PCR en temps réel [13, 14]. Enfin, nous avons complété ces analyses en recherchant la place des immunorégulateurs locaux (TWEAK/Fn-14) dans ces équilibres cytokiniques locaux [16, 17].

Très schématiquement, les femmes en échecs d'implantation présentent parfois des tableaux opposés pouvant expliquer l'échec [18] (figure 3) :

- soit on observe une suractivation locale se manifestant par un excès de cellules uNK et/ou un excès de cytokines pro-inflammatoires non immuno-régulées localement. L'embryon est alors très vraisemblablement reconnu comme étranger et détruit. L'endomètre subit une apoptose endométriale importante conduisant à son auto-destruction. Ce profil peut être impliqué dans les échecs d'implantation mais aussi les fausses couches à répétition inexpliquées par les bilans standard ;

- soit on observe une sous-activation locale se manifestant par un déficit de mobilisation des uNK et/ou une immaturité cellulaire (IL-15 basse) et/ou un défaut de sécrétion de cytokine angiogénique (IL-18) : il n'existe alors pas l'expression minimale pour permettre l'adhésion embryonnaire et le développement d'un réseau vasculaire adapté. Ce profil s'accompagne souvent d'une hypo-vascularisation locale. L'échec résulte d'une non-adhésion de l'embryon et d'une angiogenèse locale insuffisante.

Nous avons montré que ces anomalies étaient reproductibles d'un cycle à l'autre chez une même patiente à la fois pour les données vasculaires et immunologiques (recrutement local CD56, expression des ARN messagers de l'IL-18 et -15).

Sur ces bases, à partir de cohortes fertiles, nous avons établi les normes d'interprétations documentant les équilibres physiologiques et construit un algorithme décisionnel intégrant les paramètres étudiés afin de diagnostiquer l'activation locale utérine en pré-conceptionnel (sur-activation/sous-activation/activation normale). Ces données sont protégées par un brevet européen déposé en juillet 2012 (PCT/EP2013/065355).

### Conséquences thérapeutiques et personnalisation du soin en cas de profil immunologique perturbé

Sur la base diagnostique suscitée, nous proposons une personnalisation de la FIV visant soit à promouvoir la réactivité locale en cas de sous-activation, soit au contraire à la contrôler en cas de sur-activation. Il s'agit d'adopter une logique qui guidera le clinicien au cours d'une démarche globale en ce qui concerne :

- les gestes à faire avant le cycle de FIV ;
- l'ajustement de niveau de stimulation hormonale ;

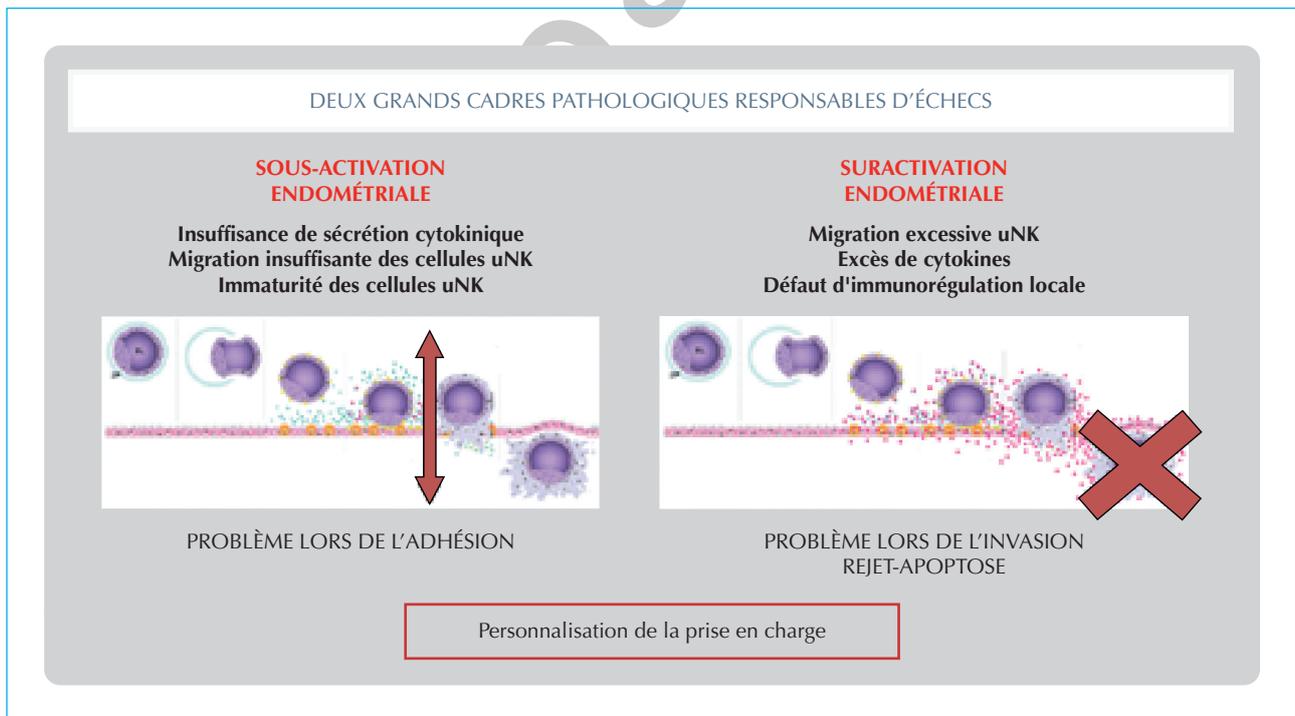


Figure 3. Les femmes en échec d'implantation présentent parfois des tableaux opposés.

- la supplémentation avec un principe thérapeutique pendant le cycle de FIV ;
- l’ajustement des thérapeutiques après transfert pendant la phase lutéale ;
- les rapports sexuels post-transfert.

L’ensemble des soins proposés fait partie du soin proposé en routine ou du savoir-faire quotidien dans le contexte qui nous intéresse. Ils sont néanmoins pratiqués sans discernement, simplement du fait du contexte clinique d’échec alors que la mise en évidence d’un mécanisme précis invite à personnaliser chaque geste en fonction de l’effet que l’on recherche.

### **Le geste utérin avant le cycle de fécondation in vitro**

Depuis 2010, il est proposé sur la base de trois études randomisées dans le cadre des échecs de FIV qu’un prélèvement endométrial – fait précisément en phase lutéale du cycle précédant la FIV – augmente les chances de grossesse [20-22]. Le mécanisme a été étudié. La création d’un signal danger *via* les *Toll-like* récepteurs active l’expression et la sécrétion d’IL-15 localement ainsi que l’expression des molécules d’adhésion et de chémokines le cycle suivant, au moment de la fenêtre d’implantation [23]. Ce geste sera donc proposé lors de mobilisation ou de maturation insuffisante des cellules uNK (IL-15 basse) afin de corriger ce déséquilibre de manière préventive. Cette action de stimulation endométriale *via* l’IL-15 ne fonctionne que si la biopsie d’endomètre est pratiquée au cours de la phase lutéale précédente, une même biopsie en phase proliférative est inefficace.

### **Le niveau de stimulation et d’implémentation œstrogénique**

La dose de FSH journalière administrée pour une FIV/ICSI varie entre 150 et 450 IU/j. Cette adaptation est fonction du profil ovarien de la patiente (notamment sa réserve ovarienne). De la dose de FSH dépendront notamment la réponse ovarienne et le taux d’œstradiol sérique au moment du déclenchement de l’ovulation en vue de la ponction d’ovocytes. Néanmoins, une fois le seuil établi, il existe toujours deux seuils potentiels d’administration en fonction de l’objectif de la stimulation. Une hyper-œstradiolémie entraîne une diminution d’expression protéique de l’IL-18 [24].

Dans des profils où l’expression des cytokines Th-2 est faible, notamment pour l’IL-18, une hyper-œstradiolémie aggraverait l’insuffisance d’expression. On recommanderait alors de diminuer les doses de FSH et de replacer les embryons congelés en cycle naturel. Dans le cas d’une hyperactivation immunitaire, en revanche, on effectuerait une stimulation hormonale normale et on replacerait les embryons congelés en cycle substitué.

### **La supplémentation d’un principe thérapeutique anti-inflammatoire ou anticoagulant pendant la fécondation in vitro dans des profils utérins avec suractivation immunitaire**

Aucun consensus n’existe sur l’administration de corticoïdes du fait du manque d’études contrôlées et randomisées dans ce contexte précis d’échecs d’implantation. Quand on se trouve confronté à des échecs, il est néanmoins très classique d’introduire un nouveau principe thérapeutique pour contrer la logique d’échecs répétés. Parmi les plus classiques figurent en premier lieu les corticoïdes, et en seconde intention les héparines de bas poids moléculaire même en l’absence de la présence d’auto-anticorps. L’administration de corticoïdes (prednisolone 20 mg/j) est le principe le plus prescrit dans ce contexte par analogie aux fausses couches inexplicables où il est fréquemment employé, notamment quand il existe une notion de cellules uNK élevées [25-27]. Néanmoins, une méta-analyse récente suggère que si les corticoïdes semblent par rapport aux autres thérapeutiques, plus légitimes [28], seulement des sous-groupes dont les indications restent à définir précisément devraient bénéficier de ce principe actif [29]. Dans notre approche, nous nous servirons de ce principe thérapeutique en cas d’hyperactivation des cellules uNK constatée lors du bilan. On associera systématiquement aux corticoïdes des antioxydants de manière à contrôler dans le même temps le stress oxydatif.

Les anticoagulants à dose iso-coagulante (40 IU/j) sont également proposés en seconde intention pour leur action anticoagulante mais surtout, dans ce contexte d’hyperactivation immunitaire locale, pour leurs propriétés découvertes récemment comme anti-complémentaires [30]. Cela est aussi par analogie aux problématiques de fausses couches inexplicables.

Enfin si la supplémentation de ces deux thérapeutiques s’avère infructueuse, nous étudions à l’heure actuelle l’action de perfusion lente d’intralipides afin de contrôler l’environnement Th-1 comme cela a été proposé dans le même contexte d’échec d’implantation associé à une cytotoxicité documentée des cellules NK circulantes.

Seul un cycle testant le principe thérapeutique et objectivant la normalisation du profil permet d’attester de la normalisation du profil endométrial immunitaire.

### **Supplémentation en phase lutéale**

Après chaque FIV, il est classique d’administrer de la progestérone pour renforcer l’activité des corps jaunes produits en post-ovulatoire et la décidualisation endométriale. La progestérone est une hormone cruciale pour préparer l’endomètre à l’état de réceptivité utérine. Les propriétés immunomodulatrices de la progestérone ont été largement documentées [31]. La dose et la voie

d'administration en France varient entre 600 et 1 200 mg en trois prises par voie vaginale. Les études randomisées et contrôlées ont prouvé un bénéfice de cette administration en termes de taux de naissances vivantes et de grossesses évolutives. Dans des profils de suractivation immunitaire, nous recommanderons la dose maximale afin de favoriser les propriétés d'immunotolérance de la progestérone. La supplémentation par gonadotrophine chorionique en phase lutéale est également classique (il s'agit de la même hormone que celle produite par l'embryon lui-même) et est proposée par certaines équipes en complément de la progestérone, voire en administration seule. Une méta-analyse récente sur le sujet suggère que sur cinq études (746 patientes) évaluant l'action de l'HCG *versus* placebo ou *versus* pas de traitement, il n'existe pas de bénéfice en termes de taux de grossesses mais un bénéfice en termes de taux de grossesses évolutives significativement plus élevé (OR 1,75 [95 % IC : 1,09-2,81]). Dans notre approche, nous recommanderons la supplémentation de la phase lutéale avec de l'HCG en cas de sous-activation immunitaire locale. En effet, Kane *et al.* ont montré que l'HCG en phase lutéale agissait positivement sur le recrutement des cellules uNK [32], sur l'angiogenèse locale (*via* le VEGF) ainsi que sur le recrutement des cellules T-régulatrices [33].

Ainsi en fonction du bilan utérin, on personnalisera la prochaine tentative, soit en potentialisant les mécanismes d'adhésion, soit en contrôlant l'activation immunitaire locale afin d'éviter le rejet.

*Pour les patientes présentant une sous-activation immunitaire locale*

Chez ces patientes, c'est l'adhésion embryonnaire que l'on cherche à stimuler en favorisant à la fois la mobilisation des cellules immunitaires mais également leur activité sécrétoire de cytokines angiogéniques. On recommande donc :

- de faire un geste endo-utérin à J21 du cycle précédant la FIV (prélèvement endo-utérin en consultation à la pipelle de Cormier) pour stimuler la mobilisation et la maturation des cellules uNK sur le cycle de transfert ;
- on recommandera des stimulations plus douces en FIV avec réduction des doses de FSH en utilisant le pallier le plus bas adapté au profil ovarien de la patiente. En cas de remplacement d'embryons congelés, on recommandera de le faire en cycles naturels. En effet, les hyperstimulations ovariennes concomitantes de la FIV induisent une hyper-œstradiolémie qui régule négativement les sécrétions de cytokines localement, notamment l'IL-18 [24]. On tente donc de ne pas aggraver la déplétion déjà présente ;
- l'hormone chorionique gonadotrophine (HCG) produite par l'embryon est apte en fenêtre implantaire à stimuler localement le recrutement des cellules

uNK et leur activité de sécrétion en stimulant le récepteur *Mannose Lectin* [32]. On adjoindra des petites doses d'HCG en phase lutéale (1 500 IU 4-6-8 jours après l'ovulation). Comme dans ce groupe une stimulation minimale est appliquée, le risque de favoriser un syndrome d'hyperstimulation ovarienne est en théorie écarté ;

- si cela est possible, on favorisera les doubles transferts avec le transfert d'un embryon à J3, puis un embryon à J5, ou le transfert au stade de blastocyste ;
- on recommande les rapports sexuels après le transfert d'embryon. Les travaux de Sarah Robertson ont en effet montré que l'exposition au liquide séminal favorise le recrutement local de cellules T-régulatrices et la sécrétion de TGF- $\beta$  permettant l'établissement d'une tolérance immunitaire [34].

*Pour les patientes présentant une suractivation immunitaire locale (recrutement excessif, excès de cytokines pro-inflammatoires non régulées)*

On adoptera l'attitude strictement inverse :

- éviter tout geste endo-utérin le cycle précédant la FIV de manière à ne pas stimuler ;
- obtenir un niveau de stimulation avec un taux élevé d'œstrogènes ou replacer l'embryon congelé en cycle substitué par des œstrogènes et de la progestérone. En effet, les œstrogènes diminuent les cytokines pro-inflammatoires déjà en excès ;
- contrôler l'excès pro-inflammatoire en introduisant dès les premiers jours du cycle de FIV des anti-inflammatoires type prednisolone en première intention ou Lovenox<sup>®</sup> en seconde intention. La thérapeutique choisie sera celle qui normalise le profil utérin de cytotoxicité ;
- rechercher un foyer infectieux de manière systématique (hydrosalpinx) dans ce sous-groupe ;
- on évitera les doubles transferts J3/J5 ;
- les rapports sexuels non protégés après transfert ne sont pas recommandés ;
- enfin on augmentera les doses d'Utrogestan<sup>®</sup> à 1 200 mg/j en phase lutéale pour promouvoir leur effet immunosuppresseur naturel [31].

**Résultats préliminaires : expérience du centre de procréation médicalement assistée des Bluets depuis 2012**

Depuis 2012, nous avons pris en charge 119 femmes présentant une histoire d'échec d'implantation répété et inexpliqué en FIV/ICSI dans le cadre de cette démarche innovante. Pour chacune, un diagnostic immunologique endométrial a été établi avec une personnalisation du soin établie si une dérégulation locale était diagnostiquée.

### **L'outcome de l'étude à l'issue de grossesse à la suite du premier transfert frais ou congelé suivant l'exploration**

Nous avons exclu de cette série les grossesses survenant spontanément le mois suivant le bilan utérin. Il est néanmoins important de noter qu'invariablement, nous observons 5 % de grossesses spontanées survenant dans le mois suivant le bilan, notamment dans les cas de sous-activation ou lors d'un cycle d'essai avec la thérapie active. En cas de sous-activation immunitaire locale, la biopsie elle-même va activer l'IL-15 pour permettre la maturation des cellules uNK immatures lors du cycle suivant. Dans les cycles avec contrôle de suractivation, c'est le principe actif lui-même qui se révélera à l'origine du début de grossesse spontanée. Enfin, la correction des troubles de prolifération favorise le développement de grossesse spontanée. Ces grossesses spontanées sont notamment observées quand l'indication du bilan est la survenue de fausses couches répétées et inexplicables.

Les patientes incluses avaient présenté des échecs d'implantation répétés et inexplicables après FIV/ICSI malgré le transfert de plus de 6 embryons. La prise en charge diagnostique consistait en la réalisation d'un bilan de réceptivité utérine jumelant une échographie avec angiographie digitalisée pour l'étude de la vascularisation endométriale avec reconstitution du volume endométrial en 3D, et une biopsie d'endomètre analysée par la société MLI afin d'établir le profil immunologique utérin de ces patientes.

La moyenne d'âge de la cohorte était de 37 ans, les patientes avaient échoué en moyenne à 2,7 tentatives avec en moyenne 7 embryons déjà remplacés.

Au vu de l'histoire de ces femmes, le taux attendu de grossesse lors du prochain transfert d'embryon se situait à 15 % de chance de développer une grossesse évolutive dans un groupe. C'est en effet le taux de grossesse évolutive observé dans un groupe de 180 femmes ayant un passé d'échec d'implantation et ayant été prises en charge dans le même centre entre 2011 et 2012.

### **Échographie endométriale en phase lutéale et déficit de prolifération**

L'échographie endométriale a retrouvé 31 cas de volume endométrial insuffisant (< 2 mL) en fenêtre d'implantation, soit un déficit de prolifération passé inaperçu dans 25 % des cas. Une prescription préventive, trois mois avant le transfert, d'anti-oxydants et de pentoxyfilline LP était systématiquement introduite en cas de déficit de prolifération. Un contrôle à trois mois était systématiquement effectué afin de s'assurer de la réponse au traitement. Sur les 31 cas, 27 avaient nettement amélioré leur prolifération endométriale.

### **Résultats des bilans utérins**

Dans le groupe étudié, nous avons retrouvé dans 77 % des cas des profils différents de ceux rencontrés dans une cohorte fertile :

- 48 % (56/119) des patientes présentaient un profil de suractivation immunitaire utérine ;
- 30 % (36/119) des patientes présentaient un profil de sous-activation immunitaire utérine ;
- 22 % (26/119) présentaient un profil d'activation immunitaire endométriale normale.

### **Taux d'implantation au premier transfert succédant à la tentative avec personnalisation du soin**

Le *tableau 1* résume le profil clinique des patientes, leur réponse à la stimulation et le devenir de cette cohorte après le premier transfert d'embryon.

Dans le groupe présentant une dysrégulation endométriale traitée, le taux d'implantation moyen de 32 % avec un taux de grossesses évolutives global est de 42 % après le premier transfert, 50 % pour le groupe présentant une suractivation et 44 % pour le groupe présentant une sous-activation. Ces taux sont plus élevés en limite de significativité que celui observé (19 %) dans le groupe sans dysrégulation objectivée. Il est à noter que dans ce groupe sans dysrégulation immunitaire observée, 3 grossesses sur 4 ont été obtenues après correction du trouble prolifératif.

Bien que cette population ne soit pas randomisée, le taux observé est largement supérieur à celui attendu alors que ni l'âge, ni le rang de tentative, ni le nombre d'embryons transférés ou leur qualité ne diffèrent entre les trois groupes.

Sur la base de ces résultats, un programme hospitalier de recherche clinique débutera en septembre 2014 afin d'évaluer le bénéfice de ce bilan préconceptionnel dans une cohorte en début de trajet de FIV. Deux cents femmes seront prises en charge de manière traditionnelle alors que 200 auront un bilan préconceptionnel utérin et une personnalisation du soin si une dysrégulation est objectivée. Cet essai nous permettra donc de vérifier de manière rationnelle et scientifique s'il est possible d'obtenir 50 % de grossesses évolutives chez toutes les femmes infertiles grâce à cette prise en charge.

Pour conclure, la prise en compte des paramètres immunologiques de réceptivité utérine accompagnée de l'adaptation de nos traitements en fonction du profil immunologique des patientes semble être une approche innovante majeure. Dans notre expérience, cette démarche permet une augmentation relative de 100 % des taux de naissance attendus. Ceci doit donc être confirmé en protocole prospectif randomisé et contrôlé afin de valider cette hypothèse. En parallèle, dans le cadre des programmes d'innovation européens, nous projetons

Tableau I. Profil clinique et outcome au premier transfert après bilan immunitaire utérin et personnalisation du soin.

	Profil immunologique utérin			
	Suractivation immunitaire	Sous-activation immunitaire	Activation immunitaire normale	
Nombre de patientes	56	36	26	
Âge moyen	36,4	36,7	36,6	0,91
Rang de tentative	3,5	3,7	3,9	0,38
Nombre d'embryons antérieurement transférés	7	7,9	8,3	0,20
Nombre d'ovocytes collectés lors de la tentative	8,6	6,9	7,1	0,30
Nombre d'embryons total obtenus lors de la tentative	6,3	5	5	0,30
Nombre d'embryons transférés lors de la tentative	1,9	1,8	2,1	0,49
Taux d'implantation (%)	34,8 %	31 %	13,5 %	0,04
Pourcentage de grossesses cliniques (6 SA)	50 % (28/56)	44 % (16/36)	23 % (4/26)	0,06
Pourcentage de grossesses évolutives (6 SA)	42,8 % (24/56)	38 % (14/36)	19 % (3/26)	0,11
Pourcentage de fausses couches	2 % (3/56)	7 % (2/36)	0 % (1/26)	NS
Nombre de cas traités pour troubles de la prolifération	25 % (14/56)	11 % (4/36)	15 % (4/26) (dont 3 seront enceintes)	NS

sur ces bases d'automatiser la méthode diagnostique et de la mettre en conformité avec la régulation européenne concernant les diagnostics médicaux innovants. Cette démarche est pour l'instant en évaluation pour les femmes ayant un passé d'échec d'implantation inexplicé ou de fausses couches spontanées répétées et inexplicées dans le cadre d'un programme d'innovation.

**Liens d'intérêts :**

**Intérêts financiers** (en lien avec le texte publié) : Nathalie Ledée dirige MatriceLAB Innove, Marie Petitbarat travaille pour cette société.

**Essais cliniques** (en lien avec le texte publié) : Étude de cohorte de femmes en échec d'implantation et ayant bénéficié d'une évaluation immunologique endométriale.

**Interventions ponctuelles** : Conférence European Society of reproductive Immunology (Budapest, mars) ; American Society of reproductive Immunology (New York).

2. Aplin JD. The cell biological basis of human implantation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000 ; 14 : 757-64.

3. Acosta AA, Elberger L, Borghi M, et al. Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. *Fertil Steril* 2000 ; 73 : 788-98.

4. Loke YW, King A, Burrows TD. Decidua in human implantation. *Hum Reprod* 1995 ; 10 (Suppl 2) : 14-21.

5. Croy BA, He H, Esadeg S, et al. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. *Reproduction* 2003 ; 126 : 149-60.

6. Koopman LA, Kocpcow HD, Rybalov B, et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2003 ; 198 : 1201-12.

7. Manaster I, Mandelboim O. The unique properties of uterine NK cells. *Am J Reprod Immunol* 2010 ; 63 : 434-44.

8. Manaster I, Mizrahi S, Goldman-Wohl D, et al. Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *J Immunol* 2008 ; 181 : 1869-76.

9. Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol* 2007 ; 29 : 95-113.

10. Chaouat G, Petitbarat M, Dubanchet S, Rahmati M, Ledee N. Tolerance to the foetal allograft? *Am J Reprod Immunol* 2010 ; 63 : 624-36.

Références

1. Psychoyos A. [From Lataste to the "window of implantation": 100 years of fascinating discoveries]. *Contracept Fertil Sex* 1993 ; 21 : 333-8.

11. Kitaya K, Yamaguchi T, Honjo H. Central role of interleukin-15 in postovulatory recruitment of peripheral blood CD16 (-) natural killer cells into human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 ; 90 : 2932-40.
12. Croy BA, Esadeg S, Chantakru S, et al. Update on pathways regulating the activation of uterine Natural Killer cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. *J Reprod Immunol* 2003 ; 59 : 175-91.
13. Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Coulomb-L'hermine A, Durand-Gasselini I, Frydman R, Chaouat G. A new role for natural killer cells, interleukin (IL)-12, and IL-18 in repeated implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004 ; 81 : 59-65.
14. Ledee-Bataille N, Bonnet-Chea K, Hosny G, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure. *Fertil Steril* 2005 ; 83 : 598-605.
15. Ledee N, Chaouat G, Serazin V, et al. Endometrial vascularity by three-dimensional power Doppler ultrasound and cytokines: a complementary approach to assess uterine receptivity. *J Reprod Immunol* 2008 ; 77 : 57-62.
16. Petitbarat M, Rahmati M, Serazin V, et al. TWEAK appears as a modulator of endometrial IL-18 related cytotoxic activity of uterine natural killers. *PLoS One* 2011 ; 6 : e14497.
17. Petitbarat M, Serazin V, Dubanchet S, et al. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)/fibroblast growth factor inducible-14 might regulate the effects of interleukin 18 and 15 in the human endometrium. *Fertil Steril* 2009 ; 94 : 1141-3.
18. Ledee N, Petitbarat M, Rahmati M, et al. New pre-conception immune biomarkers for clinical practice: interleukin-18, interleukin-15 and TWEAK on the endometrial side, G-CSF on the follicular side. *J Reprod Immunol* 2011 ; 88 : 118-23.
19. Ledee N, Lombroso R, Lombardelli L, et al. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Hum Reprod* 2008 ; 23 : 2001-9.
20. Almog B, Shalom-Paz E, Dufort D, Tulandi T. Promoting implantation by local injury to the endometrium. *Fertil Steril* 2010 ; 94 : 2026-9.
21. Barash A, Dekel N, Fieldust S, Segal I, Schechtman E, Granot I. Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2003 ; 79 : 1317-22.
22. Narvekar SA, Gupta N, Shetty N, Kottur A, Srinivas M, Rao KA. Does local endometrial injury in the non-transfer cycle improve the IVF-ET outcome in the subsequent cycle in patients with previous unsuccessful IVF? A randomized controlled pilot study. *J Hum Reprod Sci* 2010 ; 3 : 15-9.
23. Gnainsky Y, Granot I, Aldo PB, et al. Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. *Fertil Steril* 2010 ; 94 : 2030-6.
24. Ledee N, Dubanchet S, Lombroso R, Ville Y, Chaouat G. Downregulation of human endometrial IL-18 by exogenous ovarian steroids. *Am J Reprod Immunol* 2006 ; 56 : 119-23.
25. Krigstein M, Sacks G. Prednisolone for repeated implantation failure associated with high natural killer cell levels. *J Obstet Gynaecol* 2012 ; 32 : 518-9.
26. Lash GE, Bulmer JN, Innes BA, Drury JA, Robson SC, Quenby S. Prednisolone treatment reduces endometrial spiral artery development in women with recurrent miscarriage. *Angiogenesis* 14 : 523-32.
27. Quenby S, Kalumbi C, Bates M, Farquharson R, Vince G. Prednisolone reduces preconceptual endometrial natural killer cells in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2005 ; 84 : 980-4.
28. Boomsma CM, Keay SD, Macklon NS. Peri-implantation glucocorticoid administration for assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2007 : CD005996.
29. Boomsma CM, Keay SD, Macklon NS. Peri-implantation glucocorticoid administration for assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2012 ; 6 : CD005996.
30. Salmon JE, Girardi G. Antiphospholipid antibodies and pregnancy loss: a disorder of inflammation. *J Reprod Immunol* 2008 ; 77 : 51-6.
31. Szekeres-Bartho J. Progesterone-mediated immunomodulation in pregnancy: its relevance to leukocyte immunotherapy of recurrent miscarriage. *Immunotherapy* 2009 ; 1 : 873-82.
32. Kane N, Kelly R, Saunders PT, Critchley HO. Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology* 2009 ; 150 : 2882-8.
33. Perrier d'Hauterive S, Berndt S, Tsampalas M, et al. Dialogue between blastocyst hCG and endometrial LH/hCG receptor: which role in implantation? *Gynecol Obstet Invest* 2007 ; 64 : 156-60.
34. Robertson SA. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res* 2005 ; 322 : 43-52.