

2023-2024

THÈSE

pour le

DIPLOÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

DES de Gynécologie-Obstétrique

Évaluation du microbiote endométrial dans les
fausses-couches spontanées à répétition et les échecs
d'implantation répétés après fécondation *in vitro*

BEYOU Sarah

Née le 30/05/1996 à BREST (29)

Sous la direction de M. le Professeur BOUET Pierre-Emmanuel

Membres du jury

Madame la Professeur MAY PANLOUP Pascale	Président
Monsieur le Professeur BOUET Pierre-Emmanuel	Directeur
Madame la Professeur HERY ARNAUD Geneviève	Membre
Madame la Docteur PAILHORIES Hélène	Membre
Madame la Docteur LOURY Charlotte	Membre

Soutenue publiquement le :
30 août 2024

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

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

signé par l'étudiante le **29/06/2024**

SERMENT D'HIPPOCRATE

« Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu (e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverais l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité. Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré (e) et méprisé(e) si j'y manque ».

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE SANTÉ D'ANGERS

Doyen de la Faculté : Pr Nicolas Lerolle

Vice-Doyen de la Faculté et directeur du département de pharmacie :

Pr Sébastien Faure

Directeur du département de médecine : Pr Cédric Annweiler

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

ABRAHAM Pierre	PHYSIOLOGIE	Médecine
ANGOULVANT Cécile	MEDECINE GENERALE	Médecine
ANNWEILER Cédric	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT	Médecine
ASFAR Pierre	REANIMATION	Médecine
AUBE Christophe	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE	Médecine
AUGUSTO Jean-François	NEPHROLOGIE	Médecine
BAUFRETTON Christophe	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE	Médecine
BELLANGER William	MEDECINE GENERALE	Médecine
BELONCLE François	REANIMATION	Médecine
BENOIT Jean-Pierre	PHARMACOTECHNIE	Pharmacie
BIERE Loïc	CARDIOLOGIE	Médecine
BIGOT Pierre	UROLOGIE	Médecine
BONNEAU Dominique	GENETIQUE	Médecine
BOUCHARA Jean-Philippe	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE	Médecine
BOUET Pierre-Emmanuel	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE	Médecine
BOURSIER Jérôme	GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE	Médecine
BOUVARD Béatrice	RHUMATOLOGIE	
BRIET Marie	PHARMACOLOGIE	Médecine
CALES Paul	GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE	Médecine
CAMPONE Mario	CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE	Médecine
CAROLI-BOSC François-Xavier	GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE	Médecine
CASSEREAU Julien	NEUROLOGIE	Médecine
CLERE Nicolas	PHARMACOLOGIE / PHYSIOLOGIE	Pharmacie
CONNAN Laurent	MEDECINE GENERALE	Médecine
COPIN Marie-Christine	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES	Médecine
COUTANT Régis	PEDIATRIE	Médecine
CUSTAUD Marc-Antoine	PHYSIOLOGIE	Médecine
CRAUSTE-MANCIET Sylvie	PHARMACOTECHNIE HOSPITALIERE	Pharmacie
DE CASABIANCA Catherine	MEDECINE GENERALE	Médecine
DESCAMPS Philippe	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE	Médecine
D'ESCATHA Alexis	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL	Médecine
DINOMAIS Mickaël	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION	Médecine

DIQUET Bertrand	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE ; PHARMACOLOGIE CLINIQUE ; ADDICTOLOGIE	Médecine
DUBEE Vincent DUCANCELLE Alexandra	MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE	Médecine Médecine
DUVAL Olivier DUVERGER Philippe EVEILLARD Mathieu FAURE Sébastien FOURNIER Henri-Dominique FOUQUET Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE PEDOPSYCHIATRIE BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE PHARMACOLOGIE PHYSIOLOGIE ANATOMIE	Pharmacie Médecine Pharmacie Pharmacie Médecine
FURBER Alain GAGNADOUX Frédéric GOHIER Bénédicte GUARDIOLA Philippe GUILET David HAMY Antoine HENNI Samir HUNAUT-BERGER Mathilde IFRAH Norbert JEANNIN Pascale KEMPF Marie	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE CARDIOLOGIE PNEUMOLOGIE PSYCHIATRIE D'ADULTES HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION CHIMIE ANALYTIQUE CHIRURGIE GENERALE MEDECINE VASCULAIRE HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine Médecine Médecine Médecine Pharmacie Médecine Médecine Médecine Médecine
KUN-DARBOIS Daniel LACOEUILLE FRANCK LACCOURREYE Laurent LAGARCE Frédéric LANDreau Anne LARCHER Gérald LASOCKI Sigismond LEBDAI Souhil LEGENDRE Guillaume LEGRAND Erick LERMITE Emilie LEROLLE Nicolas LUNEL-FABIANI Françoise	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE RADIOPHARMACIE OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE BIOPHARMACIE BOTANIQUE/ MYCOLOGIE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRES ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION UROLOGIE GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE RHUMATOLOGIE CHIRURGIE GENERALE REANIMATION BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE	Médecine Pharmacie Médecine Pharmacie Pharmacie Pharmacie Médecine Médecine Médecine Médecine Médecine Médecine Médecine Médecine Médecine Médecine
LUQUE PAZ Damien MARCHAIS Véronique MARTIN Ludovic MAY-PANLOUP Pascale	HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE DERMATO-VENEREOLOGIE BIOLOGIE ET MEDECINE DU DEVELOPPEMENT ET DE LA REPRODUCTION	Médecine Pharmacie Médecine Médecine

MENEI Philippe	NEUROCHIRURGIE	Médecine
MERCAT Alain	REANIMATION	Médecine
PAPON Nicolas	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE	Pharmacie
PASSIRANI Catherine	CHIMIE GENERALE	Pharmacie
PELLIER Isabelle	PEDIATRIE	Médecine
PETIT Audrey	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL	Médecine
PICQUET Jean	CHIRURGIE VASCULAIRE ; MEDECINE VASCULAIRE	Médecine
PODEVIN Guillaume	CHIRURGIE INFANTILE	Médecine
PROCACCIO Vincent	GENETIQUE	Médecine
PRUNIER Delphine	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
PRUNIER Fabrice	CARDIOLOGIE	Médecine
RAMOND-ROQUIN Aline	MEDECINE GENERALE	Médecine
REYNIER Pascal	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
RICHOMME Pascal	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
RINEAU Emmanuel	ANESTHESIOLOGIE REANIMATION	Médecine
RIOU Jérémie	BIOSTATISTIQUES	Pharmacie
RODIEN Patrice	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES	Médecine
ROQUELAURE Yves	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL	Médecine
ROUGE-MAILLART Clotilde	MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE	Médecine
ROUSSEAU Audrey	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES	Médecine
ROUSSEAU Pascal	CHIRURGIE PLASTIQUE, RESTRUCTRICE ET ESTHETIQUE	Médecine
ROUSSELET Marie- Christine	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES	Médecine
ROY Pierre-Marie	MEDECINE D'URGENCE	Médecine
SAULNIER Patrick	BIOPHYSIQUE ET BIOSTATISTIQUES	Pharmacie
SERAPHIN Denis	CHIMIE ORGANIQUE	Pharmacie
SCHMIDT Aline	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
TESSIER-CAZENEUVE Christine	MEDECINE GENERALE	Médecine
TRZEPIZUR Wojciech	PNEUMOLOGIE	Médecine
UGO Valérie	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
URBAN Thierry	PNEUMOLOGIE	Médecine
VAN BOGAERT Patrick	PEDIATRIE	Médecine
VENARA Aurélien	CHIRURGIE VISCERALE ET DIGESTIVE	Médecine
VENIER-JULIENNE Marie- Claire	PHARMACOTECHNIE	Pharmacie
VERNY Christophe	NEUROLOGIE	Médecine
WILLOTEAUX Serge	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE	Médecine

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

AMMI Myriam	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE	Médecine
BAGLIN Isabelle	CHIMIE THERAPEUTIQUE	Pharmacie

BASTIAT Guillaume	BIOPHYSIQUE ET BIOSTATISTIQUES	Pharmacie
BEAUVILLAIN Céline	IMMUNOLOGIE	Médecine
BEGUE Cyril	MEDECINE GENERALE	Médecine
BELIZNA Cristina	MEDECINE INTERNE	Médecine
BENOIT Jacqueline	PHARMACOLOGIE	Pharmacie
BESSAGUET Flavien	PHYSIOLOGIE PHARMACOLOGIE	Pharmacie
BERNARD Florian	ANATOMIE ; discipline hospit : NEUROCHIRURGIE	Médecine
BLANCHET Odile	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
BOISARD Séverine	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie
BRIET Claire	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES	Médecine
BRIS Céline	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Pharmacie
CANIVET Clémence	GASTROENTEROLOGIE-HEPATOLOGIE	Médecine
CAPITAIN Olivier	CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE	Médecine
CHAO DE LA BARCA Juan-Manuel	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
CHEVALIER Sylvie	BIOLOGIE CELLULAIRE	Médecine
CHOPIN Matthieu	MEDECINE GENERALE	Médecine
CODRON Philippe	NEUROLOGIE	Médecine
COLIN Estelle	GENETIQUE	Médecine
DEMAS Josselin	SCIENCES DE LA READAPTATION	Médecine
DERBRE Séverine	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
DESHAYES Caroline	BACTERIOLOGIE VIROLOGIE	Pharmacie
DOUILLET Delphine	MEDECINE D'URGENCE	Médecine
FERRE Marc	BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
FORTRAT Jacques-Olivier	PHYSIOLOGIE	Médecine
GHALI Maria	MEDECINE GENERALE	Médecine
GUELFF Jessica	MEDECINE GENERALE	Médecine
HAMEL Jean-François	BIOSTATISTIQUES, INFORMATIQUE MEDICALE	Médicale
HELESBEUX Jean-Jacques	CHIMIE ORGANIQUE	Pharmacie
HERIVAUX Anaïs	BIOTECHNOLOGIE	Pharmacie
HINDRE François	BIOPHYSIQUE	Médecine
JOUSSET-THULLIER Nathalie	MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE	Médecine
JUDALET-ILLAND Ghislaine	MEDECINE GENERALE	Médecine
KHIATI Salim	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
LEGEAY Samuel	PHARMACOCINETIQUE	Pharmacie
LEMEE Jean-Michel	NEUROCHIRURGIE	Médecine
LE RAY-RICHOMME Anne-Marie	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
LEPELTIER Elise	CHIMIE GENERALE	Pharmacie
LETOURNEL Franck	BIOLOGIE CELLULAIRE	Médecine
LIBOUBAN Hélène	HISTOLOGIE	Médecine
MABILLEAU Guillaume	HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE ET CYTOGENETIQUE	Médecine
MALLET Sabine	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie
MAROT Agnès	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE	Pharmacie
MESLIER Nicole	PHYSIOLOGIE	Médecine

MIOT Charline	IMMUNOLOGIE	Médecine
MOUILLIE Jean-Marc	PHILOSOPHIE	Médecine
NAIL BILLAUD Sandrine	IMMUNOLOGIE	Pharmacie
PAILHORIES Hélène	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE	Médecine
PAPON Xavier	ANATOMIE	Médecine
PASCO-PAPON Anne	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE	Médecine
PECH Brigitte	PHARMACOTECHNIE	Pharmacie
PENCHAUD Anne-Laurence	SOCIOLOGIE	Médecine
PIHET Marc	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE	Médecine
POIROUX Laurent	SCIENCES INFIRMIERES	Médecine
PY Thibaut	MEDECINE GENERALE	Médecine
RIOU Jérémie	BIOSTATISTIQUES	Pharmacie
RIQUIN Elise	PEDOPSYCHIATRIE ; ADDICTOLOGIE	Médecine
RONY Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE	Médecine
ROGER Emilie	PHARMACOTECHNIE	Pharmacie
SAVARY Camille	PHARMACOLOGIE-TOXICOLOGIE	Pharmacie
SCHMITT Françoise	CHIRURGIE INFANTILE	Médecine
SCHINKOWITZ Andréas	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
SPIESSER-ROBELET Laurence	PHARMACIE CLINIQUE ET EDUCATION THERAPEUTIQUE	Pharmacie
TEXIER-LEGENDRE Gaëlle	MEDECINE GENERALE	Médecine
VIAULT Guillaume	CHIMIE ORGANIQUE	Pharmacie

AUTRES ENSEIGNANTS

PRCE		
AUTRET Erwan	ANGLAIS	Santé
BARBEROUSSE Michel	INFORMATIQUE	Santé
COYNE Ashley-Rose	ANGLAIS	Santé
O'SULLIVAN Kayleigh	ANGLAIS	Santé
RIVEAU Hélène	ANGLAIS	
PAST/MAST		
BEAUV AIS Vincent	OFFICINE	Pharmacie
BRAUD Cathie	OFFICINE	Pharmacie
DILÉ Nathalie	OFFICINE	Pharmacie
GUILLET Anne-Françoise	PHARMACIE DEUST PREPARATEUR	Pharmacie
MOAL Frédéric	PHARMACIE CLINIQUE	Pharmacie
CHAMPAGNE Romain	MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION	Médecine
GUITTON Christophe	MEDECINE INTENSIVE-REANIMATION	Médecine
KAASSIS Mehdi	GASTRO-ENTEROLOGIE	Médecine
LAVIGNE Christian	MEDECINE INTERNE	Médecine
PICCOLI Giorgina	NEPHROLOGIE	Médecine

POMMIER Pascal	CANCEROLOGIE-RADIODERAPIE	Médecine
SAVARY Dominique	MEDECINE D'URGENCE	Médecine
PLP		
CHIKH Yamina	ECONOMIE-GESTION	Médecine

REMERCIEMENTS

À mon jury,

À mon directeur de thèse, Professeur Pierre-Emmanuel BOUET, que je tiens à remercier pour m'avoir accompagné dans ce travail, ce fut très agréable de travailler sur ce projet avec vous de par votre réactivité et l'intérêt que vous avez su me transmettre sur le sujet. Merci pour les gardes et les stages passés à vos côtés qui ont été très enrichissants.

Au Professeur Pascale MAY-PANLOUP, que je remercie d'avoir accepté de présider ce jury, vos connaissances sur le sujet apporteront une expertise indéniable à cette présentation.

Au Professeur Geneviève HERY-ARNAUD, qui m'a accueillie chaleureusement sur ce projet et dans son laboratoire. Travailler sur ce sujet du microbiote qui vous anime tant a été très passionnant.

Au Docteur Hélène PAILHORIES, que je tiens à remercier d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'avoir participer à l'élaboration de cette étude.

Au Docteur Charlotte LOURY, que je tiens à remercier de faire partie de ce jury. Merci pour ton implication dans mes apprentissages, merci de cacher des champs opératoires à 4h du matin « pour ma formation ». Merci d'avoir été présente tout au long de ses 4 premières années d'internat et d'être un exemple pour nous.

REMERCIEMENTS

À ma famille, amis et collègues :

À ma mère, toujours là dans mes réussites et mes échecs, à me soutenir avec une fierté immense. MERCI

À mon père, un soutien sans faille (discret mais toujours présent), tu es un modèle pour moi dans pleins de domaines.

Je vous en serai toujours reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi.

À mes sœurs, qui ont tout suivi de ses nombreuses années d'étude, merci d'être présentes à toute ces étapes.

À Morgan, toujours présent à encaisser mes humeurs, à me servir de Punchingball, ENCORE DESOLÉE. Tu arrives à me tendre en aussi peu de temps que tu me fais sourire, ta capacité à me surprendre est impressionnante (un génie), j'espère que tu resteras à mes côtés pour encore un bon bout de temps.

À mes copines Les Chipies : Cèc, Sasso, Naf, Lulu, Guims, Kak's, Candou, Nanouk, Isa, Popsy, Loul et Alex, vous êtes mes rayons de soleil, toujours là quand il faut faire la fête, de bonne humeur et avec des idées toute plus géniales les unes que les autres. J'espère continuer à voyager et faire la fête avec vous.

À mes co-internes : Baptiste, Jessica, Elisa, Ambre, Marie et toute la team GYGY d'Angers, on a traversé des moments difficiles mais qu'est-ce qu'on a ri, ne changez rien vous êtes les meilleurs.

REMERCIEMENTS

À mes copains de la faculté de médecine de Brest, plus particulièrement Aurélia, Antoine et Soizic. Je retiens de très bons moments pendant ces années d'externat, des moments de joies et de fête.

Au nombreux chef(fe)s que j'ai pu côtoyer au cours de ces 4 années qui m'ont accompagné et soutenu dans mes apprentissages.

A l'ensemble des équipes médicales, paramédicales et administratives qui m'ont accompagné dans mes premiers pas d'interne et jusqu'ici, merci pour votre soutien, vos conseils et vos apprentissages.

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMH	Hormone Anti Müllerienne
AMP ou PMA	Assistance Médicale à la Procréation
BE	Biopsie d'endomètre
AMP ou PMA	Compte des Follicule Antraux
CFA ou AFC	European Society of Human Reproduction and Embryology
CNGOF	Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français
DPI-A	Diagnostic Pré-Implantatoire des Aneuploïdies
EC ou CE	Endométrite chronique
EIR	Échecs d'implantation répétés
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
FCSR-I	Fausses-couches spontanées à répétition dites idiopathiques
FIV	Fécondation In Vitro
FSH	Hormone Folliculo Stimulante
LH	Hormone Lutéinisante
NGS	Next Generation Sequencing
PGS	Diagnostic Génétique Pré implantatoire
PV	Prélèvement vagina
RIF	Recurrent Implantation Failure
RIPH	Recherche impliquant la recherche humain
RPC	Revue des Pratiques Cliniques
RPL	Recurrent Pregnancy Losses
RIPH	Recherche impliquant la recherche humaine
SA	Semaine d'Aménorrhée
SAPL	Syndrome des Antiphospholipides
SET	Single Embryo Transfer
TPO	Thyropéroxidase
TSH	Hormone Thyréo-Stimulante

Plan

SERMENT D'HIPPOCRATE

INTRODUCTION

MATERIEL ET METHODES

- 1. Population d'étude**
- 2. Protocole de prélèvement**
- 3. Analyse moléculaire du microbiote**
 - 3.1. Extraction de l'ADN
 - 3.2. Amplification et création des librairies
 - 3.3. Traitement bio-informatique
- 4. Analyses statistiques**
- 5. Objectifs**

RÉSULTATS

- 1. Caractéristiques de la population**
- 2. Caractéristiques comparées des microbiotes endométriaux**
 - 2.1. Comparaison taxonomique
 - 2.2. Comparaison de l'alpha diversité
- 3. Comparaison de la bêta diversité**

DISCUSSION

FORCES ET LIMITES

CONCLUSION

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

TABLE DES MATIERES

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

INTRODUCTION

L'échec d'implantation embryonnaire est une situation fréquente en assistance médicale à la procréation (AMP). À l'heure actuelle, la définition de l'échec d'implantation répété (EIR ou RIF Recurrent Implantation Failure) est toujours débattue. Récemment lors du consensus de Lugano en 2022, les experts internationaux de la médecine de la reproduction avaient défini l'échec d'implantation répété comme l'échec à au moins 3 transferts de blastocystes euploïdes, adapté en fonction de l'âge maternel¹. La société Européenne de Reproduction Humaine et d'Embryologie (ESHRE) a défini le RIF après l'échec de deux ou trois transferts d'embryons de bonne qualité, en prenant en compte l'âge maternel². La notion de chance cumulative de grossesse est également prise en compte ; avec un pourcentage de chance cumulative de grossesse supérieure à 60% devant faire suspecter un RIF. La prise en charge du RIF est principalement axée autour de deux aspects : la qualité embryonnaire et la réceptivité endométriale.

L'ESHRE préconise lors du bilan de RIF d'étudier les facteurs de risques environnementaux, l'épaisseur de l'endomètre et de rechercher un syndrome des anti-phospholipides (SAPL). Les bilans morphologique (hystéroskopie associée ou non à la recherche d'endométrite chronique), biologique (thyroïdien) et génétique (caryotypes des deux partenaires) sont à discuter en fonction du contexte. Le diagnostic pré-implantatoire des aneuploïdies (DPI-A) et l'analyse du microbiote endométriale ne sont pas recommandés à l'heure actuelle.

Les fausses couches spontanées à répétition (FCSR), sont définies selon l'ESHRE en 2022 à partir de 2 pertes fœtales avant 24 semaines d'aménorrhée (SA)³. Le Collège National des Gynécologues Obstétriciens Français (CNGOF) caractérise les FCSR à partir de 3 fausses couches précoces consécutives étant survenue avant 14 SA et pouvant inclure des fausses-couches non visualisées à l'échographie⁴. Les causes reconnues de FCS sont les anomalies chromosomiques, les malformations utérines, le SAPL et les désordres endocriniens^{5,6,7}. On retrouve 50% de FCSR associées à une aneuploïdie de l'embryon avec le reste du bilan normal^{8,9}.

En cas de RIF, le DPI-A permet d'éliminer une éventuelle cause embryonnaire. Malgré cela 10 à 30% des femmes seront à risque d'être exposées à des échecs d'implantation répétés¹⁰. En cas de FCSR, il n'est pas clairement démontré que le DPI-A augmente les chances de naissance vivante ; en revanche, il diminue le risque de récidives de FCS et donc le délai de naissance¹¹.

Pour résumer, que ce soit dans les RIF ou les FCSR, une bonne partie restent inexpliquées. Depuis quelques années, plusieurs travaux de recherche se sont intéressés au microbiote vaginal et/ou endométrial et ont pu évoquer le fait qu'un déséquilibre du microbiote (ou dysbiose) pourrait être à l'origine de RIF ou de FCSR^{12,13,14,15,16} voire de diminution des chances de naissance vivante en fécondation *in vitro* (FIV)¹⁷. Cette étude a donc pour objectif de comparer la composition du microbiote endométrial chez des patientes aux antécédents d'EIR après FIV, des patientes aux antécédents de FCSR-I et des patientes prises en charge en Assistance Médicale à la Procréation (AMP) et dont l'infertilité était liée à une origine masculine (groupe contrôle).

MATERIEL ET METHODES

Il s'agit d'une étude cas/témoins historico-prospective uni-centrique ayant comme objectif de comparer les profils microbiens endométriaux de trois groupes d'intérêt à partir de biopsies d'endomètre : des patientes (1) en échecs d'implantation répétés (EIR), (2) aux antécédents de fausses couches à répétition (FCSR-I), (3) supposées fertiles. Les patientes ont été incluses entre octobre 2017 et juin 2023 dans le cadre d'un projet de recherche de biocollection « Fertilité » pour les groupes cas et dans le cadre d'un projet de recherche impliquant la personne humaine (RIPH catégorie 2) « ENDOMETAB » pour les témoins (patientes supposées fertiles). Les deux projets ayant été soumis à des Comité de Protection des Personnes, en juin 2015 pour la biocollection « Fertilité » et le 9 novembre 2018 pour « ENDOMETAB ».

1. Population d'étude

Le groupe témoin est constitué de patientes prises en charge en AMP et dont l'infertilité est liée à une origine masculine, c'est-à-dire dont le conjoint est porteur d'une oligoasthénotératospermie sévère ou d'une azoospermie ou d'une anéjaculation ou patientes ayant une indication de FIV pour antécédent de ligature tubaire.

Un des groupes cas est constitué de patientes en échecs d'implantation répétés (EIR), définis pour cette étude comme l'échec d'obtention d'une grossesse clinique (absence d'activité cardiaque constatée à l'échographie de datation vers 6-7 SA) après au moins 3 transferts différents comportant au total au moins 4 embryons de bonne qualité (frais ou congelés).

L'autre groupe cas est constitué de patientes avec antécédent de fausse couche à répétition (FCSR-I), défini pour cette étude comme un antécédent de 3 FCS consécutives étant survenues avant 14 SA et pouvant inclure des fausses-couches non visualisées à l'échographie.

Toutes les participantes à l'étude étaient des femmes entre 18 et 40 ans, elles avaient signé un formulaire de consentement éclairé. Les critères de non-inclusion étaient pour les groupes cas : un bilan d'échec d'implantation retrouvant une origine autre qu'endométriale aux antécédents d'infertilité. Pour le groupe contrôle, le bilan initial de prise en charge AMP devaient être sans anomalies. (Critères détaillés en Annexe)

2. Protocole de prélèvement

Les biopsies d'endomètre ont été prélevées par l'un des praticiens du service autour du jour 21 du cycle soit le moment définissant la «fenêtre d'implantation», J1 correspondant au 1er jour des règles. Il s'agit d'un prélèvement réalisé à l'aide d'une pipelle de Cornier (CDD Laboratoire) qui est introduite au niveau du col de l'utérus après rinçage de col au sérum physiologique stérile. Les échantillons ont été conservés dans du formol 4%. Les échantillons (biopsies d'endomètre) ont été conservés congelés à -80°C au Centre de Ressource Biologique du CHU d'Angers.

3. Analyse moléculaire du microbiote

L'analyse par séquençage haut débit (Next Generation Sequencing ou NGS) a été conduite selon les mêmes procédures sur l'ensemble des échantillons pathologiques (cas) et contrôles (témoins). Cette analyse a été réalisée au sein du Centre Brestois d'Analyse du Microbiote (CBAM) du CHU de Brest en collaboration avec l'équipe Microbiota, Unité INSERM 1078 dirigée par la Professeur Héry-Arnaud.

Les étapes sont 1° d'extraire l'ADN des échantillons cliniques, 2° de générer des librairies par amplification et indexation, 3° de séquencer sur un séquenceur à haut débit ces librairies et 4° procéder aux analyses bio-informatiques et biostatistiques.

3.1. Extraction de l'ADN

Le défi pour les prélèvements endométriaux est qu'ils sont considérés comme des sites à très faible colonisation bactérienne ce qui augmente les risques de contamination²³. L'extraction de l'ADN des bactéries a été réalisée à l'aide du kit Ultra Deep Microbiome Prep® (Molzyme, Bremen, Allemagne) spécifiquement dédié à l'extraction de très faible quantité d'ADN bactérien à partir de biopsies. Dans un premier temps, après broyage mécanique, les biopsies ont été soumises à différentes étapes de lyse chimique permettant de détruire les protéines, les cellules humaines et/ou animales ainsi que l'ADN extra cellulaire. L'extraction a ensuite été réalisée en phase solide sur des colonnes de centrifugation avec des membranes de silice et des sels chaotropes, utilisant les propriétés de liaison de l'ADN à la silice. Les sels chaotropes perturbant la liaison hydrogène entre les brins et facilitent la liaison de l'ADN à la silice en rendant

les acides nucléiques hydrophobes. L'ADN est ensuite réhydraté avec des solutions aqueuses à faible teneur en sel permettant l'élution de l'ADN. A chaque étape d'extraction, des témoins négatifs ainsi qu'un témoin positif (« mock community ») ont été analysés afin respectivement de limiter un maximum le biais de contamination et de vérifier l'efficacité du protocole sur toutes les étapes. L'ADN total extrait a été quantifié à l'aide du Qubit® 2.0 Fluorometer en utilisant le kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.2. Amplification et création des librairies

Des régions d'intérêt, correspondant aux régions hypervariables V3-V4 du gène 16S rRNA, ont été dans un premier temps amplifiée par PCR avec des amores spécifiques (polymérase KAPA HiFi HotStart). Des étiquettes ont été ajoutées aux extrémités des amplicons par ligations en utilisant le kit Nextera XT Index (Illumina). Les libraires ont été quantifiées de nouveau à l'aide du Qubit® 2.0 Fluorometer en utilisant le kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Les librairies de séquençage sont réalisées à l'aide du kit 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina).

3.3. Traitement bio-informatique

Le traitement bio-informatique a été réalisé via le pipeline d'analyse du CBAM. Les fichiers FATSQ bruts ont été démultiplexés et filtrés. Les séquences de mauvaise qualité (<QV20) ont d'abord été supprimées, puis les séquences restantes ont été traitées avec la pipeline informatique DADA2 pour la déréPLICATION, la correction d'erreurs et la suppression des séquences chimères. Les séquences ont été regroupées en OTU (Unité Taxonomique Opérationnelle)

en utilisant dbOTU3, et l'affiliation taxonomique a été réalisée avec Silva (v.138) en utilisant un seuil de confiance à 70%.

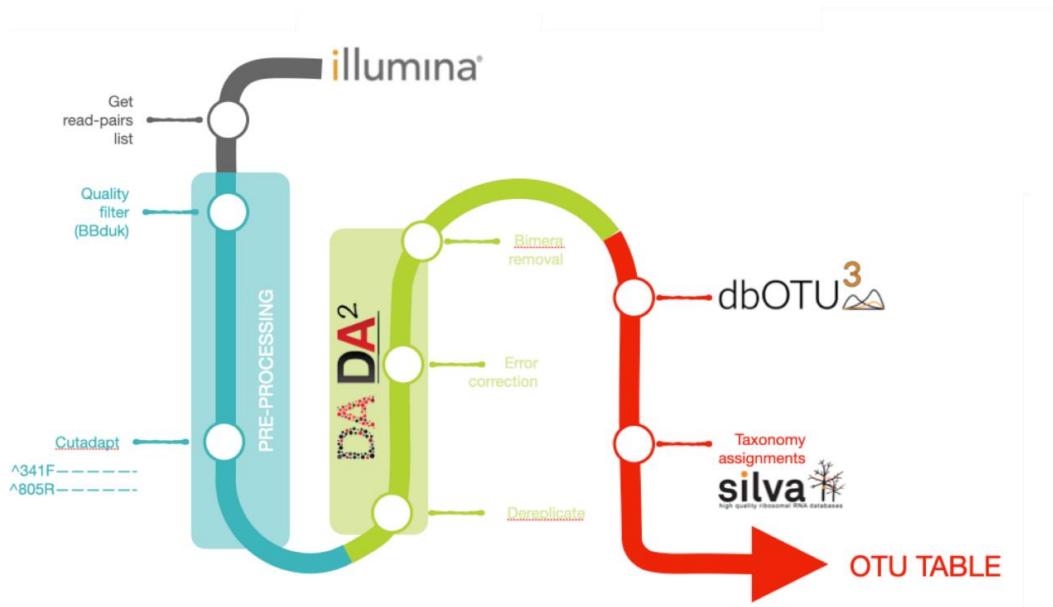


Figure 1: Pipeline analysis of the CBAM (Centre Brestois d'Analyse du Microbiote)

Les analyses statistiques pour l'exploitation des données de NGS ont été réalisées au sein de l'Equipe Microbiota, Unité INSERM 1078. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (v4.0.3) et les packages *Phyloseq* et *MixOmics*. L'alpha-diversité a été quantifiée à l'aide des indices de richesse Chao-1, d'entropie de Shannon et d'uniformité de Simpson. L'analyse des composants principaux (Principal Component Analysis ou PCA, analyse multivariée non supervisée) et le Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA, analyse multivariée supervisée) avec une transformation dite centrée (centered log ratio, clr) ont été utilisés pour étudier la similitude de la structure des microbiotes des différents échantillons.

4. Analyses statistiques

Pour les variables qualitatives, les résultats ont été rapportés en effectifs et pourcentages puis comparés en utilisant le test de Chi-deux de Pearson ou le test exact de Fisher. Pour les variables quantitatives, les résultats ont été rapportés en moyenne et écart-type (ou en médiane avec 25^e et 75^e centile) puis comparés en utilisant le test t de Student ou le test non paramétrique de Mann-Whitney ou le test d'Anova. Le seuil de significativité était fixé à 0.05 et tous les tests étaient bilatéraux.

5. Objectifs

L'objectif principal était de comparer la composition du microbiote endométrial chez des patientes aux antécédents d'EIR après FIV, des patientes aux antécédents de FCSR-I ainsi que des patientes prise en charge en AMP et dont l'infertilité est liée à une origine masculine (groupe témoin). Les critères d'évaluation principaux étaient d'étudier les paramètres principaux du microbiote endométrial : composition et biodiversité.

L'objectif secondaire est de mettre en évidence une dysbiose dans les groupes pathologiques.

RÉSULTATS

1. Caractéristiques de la population

Les trois groupes étaient composés de 30 patientes chacun. Les caractéristiques cliniques sont comparées dans le tableau 1. Il n'existe pas de différences significatives concernant l'âge, l'indice de masse corporelle (IMC), la parité, la consommation de tabac et l'antécédent d'endométrite chronique. En revanche, on retrouve des différences significatives concernant la gestité, le nombre de fausses couches spontanées et d'échecs d'implantation.

Tableau 1: Characteristics of participants: The non-parametric Mann-Whitney test was used for quantitative variables and the Fisher's Exact Test for qualitative variables with GraphPad Prism, v.8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered significant at p-value <0.05.

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

Repeated implantation failures (RIF) and unexplained recurrent pregnancy loss (U-RPL).

BMI = body mass index.

p-value: test d'Anova.

	Control group n= 30	U-RPL group n = 30	RIF group n= 30	p-value
Age (years)	29.8 ± 4.4	31.5 ± 5.6	31.6 ± 2.8	0.6
BMI (kg/m²)	25 ± 5	25.3 ± 5.2	23.8 ± 4.6	0.43
Smoking status (no smoker)	23	20	19	0.24
Gestity	1 ± 1.5	4.8 ± 1.8	0.8 ± 0.8	<0.0001
Parity (birth >22SA)	0.7 ± 1.2	0.3 ± 0.6	0.4 ± 0.5	0.15
Number of recurrent pregnancy loss (0-14SA)	0.1 ± 0.3	4 ± 1.6	0.2 ± 0.4	<0.0001
CE	9	8	6	0.65

2. Caractéristiques comparées des microbiotes endométriaux

2.1. Comparaison taxonomique

Au total, 90 librairies (84 échantillons, 5 kitomes et 1 « mock community ») ont été analysées. Une médiane de 50 996 reads par échantillons a été obtenue après séquençage. Après les différentes étapes bio-informatiques appliquées pour ne retenir que des séquences de qualités, la médiane est de 14 106 reads par échantillons.

Les phyla les plus représentés dans les 3 groupes de patientes sont les Actinobacteriota (ex-Actinobacteria) dont fait partie *Gardnerella vaginalis*, les Bacillota (ex-Firmicutes) représenté par les lactobacilles et les Bacteroidota (ex-Bacteroidetes) avec *Prevotella*.



Figure 2: Composition of the bacterial community. Bar chart of the relative abundancy of the most abundant species, groups according to the 3 populations of interest.

La distribution microbienne représentée sur une « heatmap » (Figure 2) retrouve en moyenne 42% de *Lactobacillus crispatus* pour le groupe EIR, 25% pour le groupe FCSR et 39% pour le groupe contrôle ($p = 0.30$), entre le groupe FCSR et celui contrôle ($p=0.24$). *Lactobacillus gasseri* représentent 10% des espèces retrouvées dans les échantillons du groupe contrôle, 4% de celles du groupe EIR et 11% des échantillons du groupe FCSR ($p=0.59$).

Lactobacillus iners représentent 26% des espèces bactériennes du groupe contrôle, 32% de celles du groupe EIR et 35% de celles du groupe FCS (p=0.70). *Lactobacillus jensenii* représente 4% des espèces bactériennes dans le groupe contrôle, 0.4% dans le groupe EIR et 2.7% dans celui FCSR (p=0.43). Il est mis en évidence 11% de *Gardnerella vaginalis* dans les échantillons du groupe contrôle, 10% dans ceux du groupe EIR et 14.5% dans ceux du groupe FCSR (p=0.84), entre le groupe contrôle et le groupe FCSR (p=0.65).

2.2. Comparaison de l'alpha diversité

La diversité alpha est une mesure indiquant la diversité d'un échantillon unique. La comparaison entre les trois groupes a été effectuée en s'appuyant sur le calcul de 3 indices à partir des données raréfiées à 1000 séquences par échantillon : indices de richesse (Chao1), de diversité (Shannon) et de similarité (Simpson). Il a donc été exclu de l'analyse 6 échantillons sur les 90 initiaux qui présentaient moins de 1000 séquences analysables : 2 appartenant au groupe contrôle, 3 au groupes EIR et 1 à celui FCS-R.

L'indice de Chao1 est l'outil utilisé pour estimer le nombre d'espèces (richesse spécifique) d'une communauté à partir d'un échantillon. L'indice de Shannon quantifie les types de taxons distincts trouvés dans une communauté donnée. L'indice de Simpson exprime la probabilité que deux micro-organismes soient d'espèces différentes s'ils sont sélectionnés au hasard dans une communauté infiniment grande.

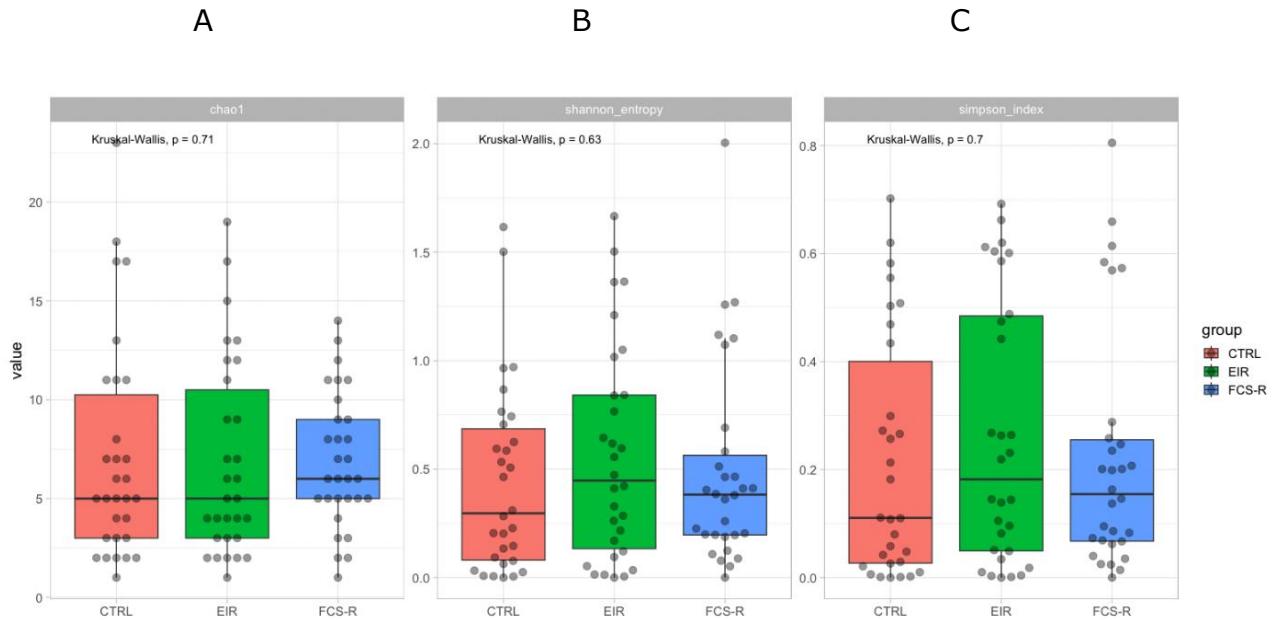


Figure 3: Alpha diversity analysis in the study population. (A) Comparative analysis of the Chao 1 index ($p=0.71$) and (B) the Shannon diversity index ($p = 0.63$) and (C) the Simpson diversity index ($p = 0.7$) for the FCSR (RPL) and EIR (RIF) and control groups. Black round indicate each sample and horizontal black line the midpoint of the alpha-diversity indexes.

Les tests de Kruskal-Wallis (Figure 3) n'ont révélé aucune différence significative entre les 3 groupes de patientes pour aucun des 3 indices d'alpha diversité avec des valeurs de p-value respectives de 0,71, 0,63 et 0,7.

3. Comparaison de la bêta diversité

La diversité bêta exprime la variation de la composition en différents taxons bactériens parmi les échantillons étudiés. L'étude de celle-ci s'est appuyée sur l'indice de Bray-Curtis qui permet de mesurer une dissimilarité entre 2 communautés. Les valeurs sont situées entre 0 et 1 ; plus cette valeur est proche de 0, plus ces communautés se ressemblent. La comparaison de la diversité bêta entre les trois groupes a été représentée graphiquement par l'analyse en composante principale (PCA) calculée à partir de l'indice de Bray-Curtis (Figure 4). La PCA est une méthode de représentation de données de dissimilarité selon 2 axes, les points ainsi regroupés sont nommés « clusters ».

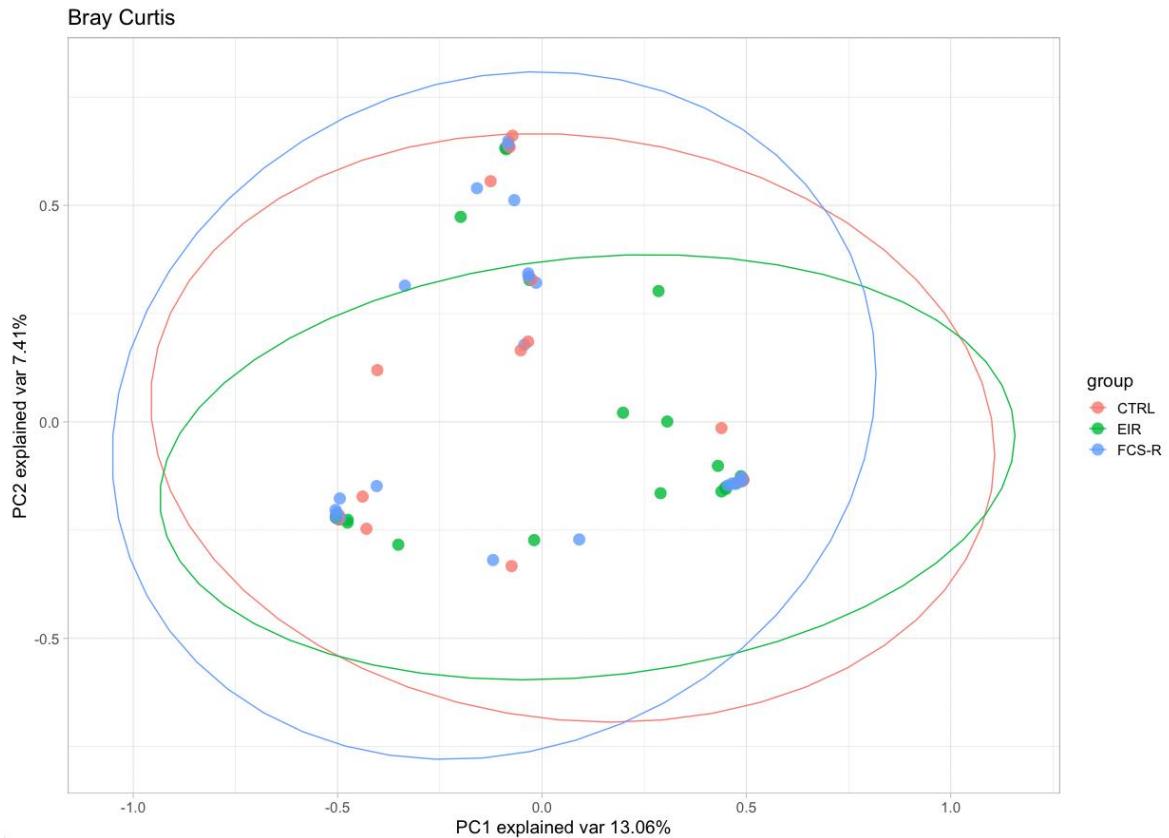


Figure 4: Bêta-diversity analysis using the Bray-Curtis distance. PCOA showing the clustering between the EIR (green), control (red) and FCS-R (blue) groups, in which each dot represents a sample. PC1 is the principal coordinate component that generates the largest difference in the samples, with a value of 13.06%. PC2, harbors a value of 7.4%.

Ces analyses montrent une séparation en trois clusters, indépendant de notre cohorte. Les pourcentages de variances expliqués par chaque composante principale (PC) ont été affichés sur les axes, avec PC1 expliquant 13,06% de la variance totale et PC2 expliquant 7,41% (Figure 4).

Le graphique (Figure 5A) retrouve les 3 principaux clusters indépendant des groupes formés dans notre cohorte. La figure 5B met en évidence une espèce représentative de chaque cluster : *L. crispatus*, *L. iners* et *L. gasseri*.

G. vaginalis est aussi retrouvé dans un cluster de taille moins importante.

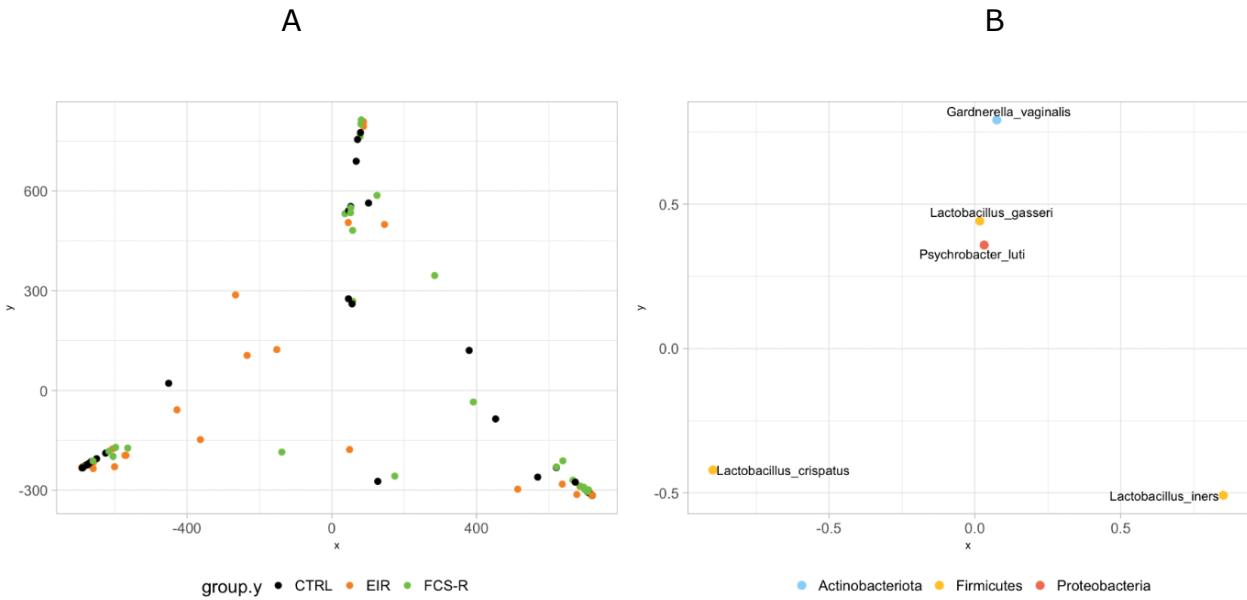


Figure 5: Bêta diversity using PCA, (A) each point corresponding to a sample belonging to the 3 groups: EIR (orange), FCSR (green) and control (black), (B) representative species of the clusters.

L'analyse supervisée en fonction des groupes de patientes (Partial Least Squares-discriminant analysis, PLS-DA) n'a pas permis de mettre en évidence un modèle robuste permettant de séparer significativement les trois groupes à partir de la structure de leur microbiote (Figure 6).

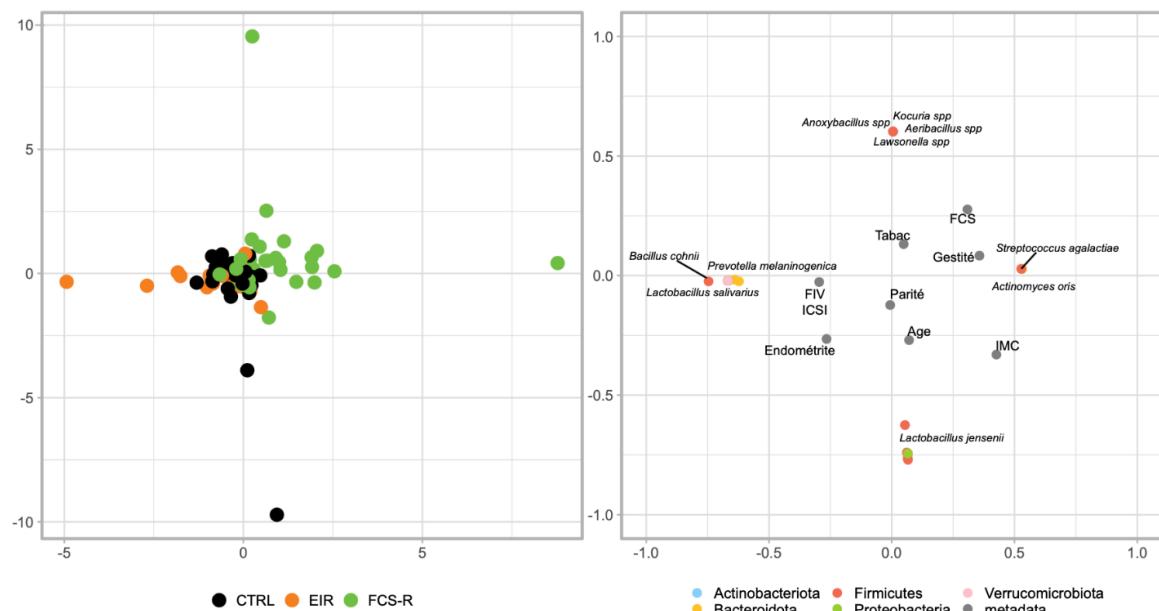


Figure 6: Analysis in PLS-DA, (A) each point corresponding to a sample belonging to the 3 groups: EIR (orange), FCSR (green) and control (black), (B) metadata based on characteristics of the population and species distribution.

DISCUSSION

Dans cette étude historico-prospective, les analyses du microbiote de l'endomètre par séquençage de l'ADNr 16S ont été réalisées sur l'endomètre recueilli en milieu de phase lutéale chez les femmes avec des FCSR, les femmes avec des EIR et les femmes témoins. Il apparaît que les microbiotes endométriaux sont essentiellement constitués par les lactobacilles. Sur les échantillons étudiés dans ce travail, il n'y avait pas de différences de profils taxonomiques des trois groupes cliniques étudiés (FCS-R, EIR et contrôle). Cependant, l'analyse non supervisée a révélé une séparation de la cohorte en trois clusters taxonomiques représentés par 3 espèces de lactobacilles : *L. iners*, *L. crispatus*, et *L. gasseri*.

Ces résultats font écho aux travaux de Ravel en 2011 sur le microbiote vaginal, qui ont identifié cinq grands groupes de communautés bactériennes (nommées « *community states types* » ou CST)¹⁸. Parmi ceux-ci, quatre groupes sont associés à une forte majorité de *L. crispatus* (type I), *L. gasseri* (type II), *L. iners* (type III) et *L. jensenii* (type V). Le dernier groupe (type IV) est composé d'une « flore » polymicrobienne comprenant diverses bactéries anaérobies.

De nombreuses études se sont intéressées au microbiote de l'appareil reproducteur féminin en particulier vaginal qui serait un indicateur du succès de l'implantation. Des études ont montré que la présence majoritaire de lactobacilles serait fortement corrélée au succès de la reproduction tandis qu'une issue de reproduction défavorable serait associée à un environnement de lactobacilles non dominant, à une diversité et à une richesse microbienne plus

élevée^{13 19}. Cela pourrait s'expliquer par une activité pro-inflammatoire dans un contexte de dysbiose¹².

Les études traitant de l'influence du microbiote de l'appareil reproducteur féminin sur la réceptivité endométriale dans le cadre de la fertilité se multiplient. L'étude de Moreno et al. en 2016, est l'une des premières à avoir évalué le microbiote endométrial dans l'infertilité en utilisant la technique de séquençage avec l'ARN 16S¹⁷. Elle retrouvait qu'un taux de lactobacilles supérieur à 90% serait un facteur pronostique d'un meilleur taux d'implantation, de grossesse clinique et vivante en FIV par rapport aux patientes avec un microbiote endométrial non-lactobacilles dominant.

Les études s'intéressant au microbiote endométrial dans un contexte de FCSR sont peu nombreuses, toutes rétrospectives et avec de faibles nombres de sujets dans les cohortes étudiées. Elles retrouvaient en général moins de lactobacilles et particulièrement de *L.crispatus* (17% vs 46%, p=0.04)⁶. Il était mis en évidence une diversité et une richesse bactérienne plus importante dans les échantillons d'endomètre des patientes avec FCS-R avec des espèces telles que *G. vaginalis*, *Acinetobacter* et *Ureaplasma*^{20 21}.

Concernant les EIR et le microbiote endométrial, les études sont de la même manière que celles sur les FCSR, soit peu importantes et réalisées sur de faibles effectifs. Une étude retrouvait dans les profils microbiotiques considérés comme anormaux par le EMMA test (test métagénomique du microbiote endométrial), une grande variété de bactéries et en particulier : *Streptococcus*, *Gardnerella*, *Atopobium* et *Bifidobacterium*¹⁴. L'étude de Lozano et al de 2023, a identifié un profil de microbiote endométrial chez les patientes avec échec d'implantation

retrouvant significativement plus de *Prevotella*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* et *Dialister* et moins de lactobacilles¹⁵.

Une des dernières études publiées en août 2023 était une étude de cohorte prospective s'intéressant au microbiote endométrial et à l'endométrite chronique comparant trois groupes (FCSR, EIR et supposés fertiles) composés respectivement de 24, 27 et 29 patientes²². Les résultats suggéraient que l'endométrite chronique serait impliquée dans la physiopathologie des FCSR et EIR. Cependant, il n'avait pas été mis en évidence de différence de composition dans le microbiote endométrial entre les 3 groupes comparés : FCSR, EIR et témoins fertiles, objectif initial de l'étude.

Ces résultats semblent concordants avec ceux de notre étude, en effet nous n'avons pas mis en évidence de différence significative dans la composition du microbiote entre les groupes FCSR, EIR et contrôle. En moyenne, il y avait une moins forte abondance de *L. crispatus* dans le groupe FCSR (25% vs 39% contrôle) et de *G. vaginalis* (14.5% FCSR vs 11% contrôle), mais sans que ce résultat soit statistiquement significatif.

Il n'existe pas de consensus sur la définition d'un microbiote type de l'endomètre et son impact sur l'appareil reproducteur en termes de fertilité et d'issue de grossesse. Le défaut de consensus pourrait être due à l'absence de grandes cohortes dans les études sur le microbiome et aux difficultés d'extraction de cette biomasse bactérienne faible de l'endomètre.

Cependant, il semble exister un continuum entre le microbiote vaginal et celui de l'endomètre par un mode ascendant de transmission par le canal cervical²³. Une étude retrouvait une très forte corrélation individuelle entre le prélèvement vaginal (PV) et la biopsie d'endomètre (BE) avec un RR=0.85⁶.

Ce qui semble être confirmé en 2023 par une étude russe qui retrouvait une bonne concordance pour *G. vaginalis*, *Mycoplasma*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterobacter* et HPV²⁴. Et encore très récemment, une étude présentée à l'ESHRE en juillet 2024 comparant les PV et les BE de 60 patientes prises en charge en PMA retrouvaient de fortes similitudes des compositions microbiennes des deux sites (*L. crispatus* r= 0.9, *L. iners* r= 0.9, *L. gasseri* r=1, *L. jensenii* r=0.9 et *G. vaginalis* r=0.7, r= coefficient de corrélation linéaire)²⁵. Une autre étude a montré une grande similitude de distribution des bactéries dans des échantillons d'endomètre prélevés à travers l'orifice cervical avec celle prélevée pendant une chirurgie (laparoscopie ou laparotomie)¹⁶. Cela suggère l'idée que l'échantillonnage (minimum invasif) de la muqueuse cervicale ou vaginale pourrait être utilisé comme substitut pour étudier le microbiote utérin. Ainsi se pose la question de l'intérêt de la réalisation d'un geste invasif (biopsie d'endomètre) pour l'étude du microbiote utérin si un simple prélèvement vaginal apporterait des informations pertinentes sur l'environnement endométrial. La multiplication des offres (payantes et onéreuses) d'analyse du microbiote endométrial dans le contexte d'échec d'implantation et/ou fausses couches à répétitions, ne semble donc pas justifiée pour le moment au vu de la littérature et de nos résultats.

L'absence de signature microbienne conforte aussi la place de l'origine embryonnaire aux problèmes d'implantation ou de fausse couche à répétition. En effet, selon *Franasiak* dans *Fertil Steril* en 2014 et *Ata B* en 2021, la cause la plus fréquente d'EIR serait l'aneuploïdie embryonnaire^{26 27}. Ainsi, la définition de RIF est remise en question et sa prévalence probablement surestimée. Finalement, d'après l'étude de *Pirtea et al*, les véritables échecs

d'implantation répétés (si l'on transfert des embryons euploïdes) existeraient chez moins de 5% des couples infertiles²⁸. En effet, à partir d'une cohorte de 4449 patientes, les auteurs retrouvaient 95% de taux de naissance vivante cumulé après 3 SET (Single Embryo Transfer) de J5 euploïdes. L'aneuploïdie serait aussi la cause principale de FCSR-I avec 58% d'aneuploïdie retrouvé sur une cohorte de 458 fausses couches⁹. Le taux d'euploïdie des blastocystes d'une patiente de moins de 35 ans est évalué en moyenne à 60%²⁶. Dans notre étude, les patientes des groupes « cas » avaient toutes des bilans morphologiques et biologiques normaux, bilans conformes aux recommandations ESHRE 2023². Nous sommes donc dans le cadre d'EIR et FCSR considérés comme idiopathique. Ainsi devant l'absence de dysbiose mise en évidence et ne pouvant exclure les embryons aneuploïdes (DPI-A non autorisé en France), nous pouvons suspecter dans notre cohorte une origine embryonnaire majoritaire expliquant leurs pathologies.

L'étude du microbiote endométrial amène à réfléchir sur d'autres problématiques que l'infertilité, notamment la manière dont les perturbations du microbiote vagino-utérin pourraient être à l'origine d'affections bénignes ou malignes : endométriose, cancer de l'endomètre^{29,30}.

Il existe d'autres perspectives sur l'étude du microbiote génital avec la publication récente d'un case report sur la transplantation de microbiote vaginal. Il s'agissait du cas d'une patiente avec de multiples antécédents de fausses couches tardive et de morts fœtales *in utero* dans un contexte de vaginose résistante, ponctué d'une naissance vivante après transplantation de microbiote vaginal³¹.

FORCES ET LIMITES

Cette étude présente plusieurs points forts et limites. La population étudiée est répartie en trois groupes homogènes dans leurs caractéristiques. Le groupe contrôle est représenté par des patientes représentatives de la population générale supposée fertile, mais prises en charge dans le cadre de la PMA donc ayant effectuées les examens permettant d'éliminer des pathologies connues pour altérer l'environnement endométrial (SOPK, endométriose, polypes...)³². Le recueil des biopsies est effectué en milieu de cycle, ce qui permet d'avoir des résultats représentatifs de l'endomètre au moment de l'implantation.

Concernant les limites, les échantillons à faible abondance bactérienne, tels que l'endomètre, sont susceptibles d'être contaminés. Bien que lors du prélèvement, le contact avec les parois vaginales a été évité, la contamination vaginale ne peut être exclue. La théorie du continuum vagin-endomètre et la mise en évidence de résultats très similaires entre la voie laparoscopique et transcervicale valide la voie transcervicale pour l'analyse du microbiote endométrial¹⁶. La contamination par de l'ADN bactérien exogène, notamment de l'environnement de ces échantillons à faible biomasse, est un élément majeur dans la méthodologie de cette étude. De multiples contrôles qualité (témoins négatifs lors de chaque étape d'extraction) ont été réalisés, ayant pour conséquence une perte de certaines données mais permettant de limiter un maximum ce biais. Afin de respecter au mieux les conditions pré-analytiques propres à l'analyse du microbiote de faible biomasse, il eût fallu introduire des témoins dès l'étape de prélèvement.

CONCLUSION

L'étude démontre une richesse et une diversité globale du microbiote endométrial, principalement dominé par des lactobacilles. Il n'a pas été mis en évidence de dysbiose du microbiote endométrial dans le contexte de fausses couches à répétition et d'échecs d'implantation répétés. Néanmoins, l'analyse révèle trois clusters distincts de microbiotes endométriaux corrélés à des espèces spécifiques de lactobacilles (*L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*) comme cela a été décrit dans le microbiote vaginal¹⁸. Dans ce contexte de FCSR et d'EIR, la réalisation d'une biopsie d'endomètre ayant uniquement pour but l'analyse du microbiote utérin ne semble à ce jour pas justifiée.

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1: Pipeline analysis of the CBAM</i>	22
<i>Figure 2: Composition of the bacterial community.</i>	25
<i>Figure 3: Alpha diversity analysis in the study population</i>	27
<i>Figure 4: Bêta-diversity analysis using the Bray-Curtis distance.</i>	28
<i>Figure 5: Bêta diversity using PCA</i>	29
<i>Figure 6: Analysis in PLS-DA</i>	29

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Characteristics of participants 24

TABLE DES MATIERES

SERMENT D'HIPPOCRATE.....	4
INTRODUCTION	16
MATERIEL ET METHODES	18
1. Population d'étude.....	18
2. Protocole de prélèvement.....	19
3. Analyse moléculaire du microbiote	20
3.1. Extraction de l'ADN	20
3.2. Amplification et création des librairies.....	21
3.3. Traitement bio-informatique.....	21
4. Analyses statistiques	23
5. Objectifs	23
RÉSULTATS	24
1. Caractéristiques de la population	24
2. Caractéristiques comparées des microbiotes endométriaux	25
2.1. Comparaison taxonomique	25
2.2. Comparaison de l'alpha diversité	26
3. Comparaison de la bêta diversité.....	27
DISCUSSION	30
FORCES ET LIMITES	35
CONCLUSION.....	36
LISTE DES FIGURES	37
LISTE DES TABLEAUX.....	38
TABLE DES MATIERES	39
BIBLIOGRAPHIE.....	40
ANNEXES.....	43

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ Pirtea P, Cedars MI, Devine K, Ata B, Fransasiak J, et al. Recurrent implantation failure: reality or a statistical mirage?: Consensus statement from the July 1, 2022 Lugano Workshop on recurrent implantation failure. *Fertil Steril.* juill 2023;120(1):45-59.
- ² Cimadomo D, de los Santos MJ, Griesinger G, Lainas G, Le Clef N, McLernon DJ, et al. ESHRE good practice recommendations on recurrent implantation failure†. *Hum Reprod Open.* 15 juin 2023;2023(3):hoad023.
- ³ Recurrent pregnancy loss: <https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/Guidelines/Recurrent-pregnancy-loss>
- ⁴ https://cngof.fr/app/pdf/RPC/RPC%20DU%20CNGOF/2014/CNGOF_2014_pertes_grossesse.pdf?x55732
- ⁵ Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet.* 12 août 2006;368(9535):601-11.
- ⁶ Peuranpää P, Holster T, Saqib S, Kalliala I, Tiitinen A, Salonen A, et al. Female reproductive tract microbiota and recurrent pregnancy loss: a nested case-control study. *Reproductive BioMedicine Online.* 1 nov 2022;45(5):1021-31.
- ⁷ de Assis V, Giugni CS, Ros ST. Evaluation of Recurrent Pregnancy Loss. *Obstetrics & Gynecology.* mai 2024;143(5):645.
- ⁸ Dahdouh EM, Kutteh WH. Genetic testing of products of conception in recurrent pregnancy loss evaluation. *Reprod Biomed Online.* 1 juill 2021;43(1):120-6.
- ⁹ Qu S, Wang L, Cai A, Cui S, Bai N, Liu N, et al. Exploring the cause of early miscarriage with SNP-array analysis and karyotyping. *J Matern Fetal Neonatal Med.* janv 2019;32(1):1-10.
- ¹⁰ Pirtea P, Cedars MI, Devine K, Ata B, Fransasiak J, Racowsky C, et al. Recurrent implantation failure: reality or a statistical mirage?: Consensus statement from the July 1, 2022 Lugano Workshop on recurrent implantation failure. *Fertility and Sterility.* 1 juill 2023;120(1):45-59.
- ¹¹ Murugappan G, Shahine LK, Perfetto CO, Hickok LR, Lathi RB. Intent to treat analysis of in vitro fertilization and preimplantation genetic screening versus expectant management in patients with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod.* août 2016;31(8):1668-74.
- ¹² Gao X, Louwers YV, Laven JSE, Schoenmakers S. Clinical Relevance of Vaginal and Endometrial Microbiome Investigation in Women with Repeated Implantation Failure and Recurrent Pregnancy Loss. *Int J Mol Sci.* 3 janv 2024;25(1):622.
- ¹³ Ichiyama T, Kuroda K, Nagai Y, Urushiyama D, Ohno M, Yamaguchi T, et al. Analysis of vaginal and endometrial microbiota communities in infertile women with a history of repeated implantation failure. *Reprod Med Biol.* juill 2021;20(3):334-44.
- ¹⁴ Iwami N, Kawamata M, Ozawa N, Yamamoto T, Watanabe E, Mizuuchi M, et al. Therapeutic intervention based on gene sequencing analysis of microbial 16S ribosomal RNA of the intrauterine microbiome improves pregnancy outcomes in IVF patients: a prospective cohort study. *J Assist Reprod Genet.* janv 2023;40(1):125-35.
- ¹⁵ Lozano FM, Lledó B, Morales R, Cascales A, Hortal M, Bernabeu A, et al. Characterization of the Endometrial Microbiome in Patients with Recurrent Implantation Failure. *Microorganisms.* 14 mars 2023;11(3):741.
- ¹⁶ Chen C, Song X, Wei W, Zhong H, Dai J, Lan Z, et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun.* 17 oct 2017;8:875.
- ¹⁷ Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martínez-Blanch JF, Jiménez-Almazán J, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* 1 déc 2016;215(6):684-703.
- ¹⁸ Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 15 mars 2011;108(supplement_1):4680-7.
- ¹⁹ Bernabeu A, Lledo B, Díaz MaC, Lozano FM, Ruiz V, Fuentes A, et al. Effect of the vaginal microbiome on the pregnancy rate in women receiving assisted reproductive treatment. *J Assist Reprod Genet.* oct 2019;36(10):2111-9.

-
- ²⁰ Liu Y, Wong KKW, Ko EYL, Chen X, Huang J, Tsui SKW, et al. Systematic Comparison of Bacterial Colonization of Endometrial Tissue and Fluid Samples in Recurrent Miscarriage Patients: Implications for Future Endometrial Microbiome Studies. Clin Chem. déc 2018;64(12):1743-52.
- ²¹ Shi Y, Yamada H, Sasagawa Y, Tanimura K, Deguchi M. Uterine endometrium microbiota and pregnancy outcome in women with recurrent pregnancy loss. Journal of Reproductive Immunology. 1 août 2022;152:103653.
- ²² Takimoto K, Yamada H, Shimada S, Fukushi Y, Wada S. Chronic Endometritis and Uterine Endometrium Microbiota in Recurrent Implantation Failure and Recurrent Pregnancy Loss. Biomedicines. 27 août 2023;11(9):2391.
- ²³ Moreno I, Simon C. Relevance of assessing the uterine microbiota in infertility. Fertil Steril. août 2018;110(3):337-43.
- ²⁴ Tapilskaya NI, Savicheva AM, Shalepo KV, Budilovskaya OV, Gzgzyan AM, Bespalova ON, et al. Local Immune Biomarker Expression Depending on the Uterine Microbiota in Patients with Idiopathic Infertility. Int J Mol Sci. 20 avr 2023;24(8):7572.
- ²⁵ The vaginal and endometrial microbiome: do they tell the same story? | Human Reproduction | Oxford Academic.
- ²⁶ Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. Fertil Steril. mars 2014;101(3):656-663.e1.
- ²⁷ Ata B, Kalafat E, Somigliana E. A new definition of recurrent implantation failure on the basis of anticipated blastocyst aneuploidy rates across female age. Fertil Steril. nov 2021;116(5):1320-7.
- ²⁸ Pirtea P, De Ziegler D, Tao X, Sun L, Zhan Y, Ayoubi JM, et al. Rate of true recurrent implantation failure is low: results of three successive frozen euploid single embryo transfers. Fertil Steril. janv 2021;115(1):45-53.
- ²⁹ Colonetti T, Saggioratto MC, Grande AJ, Colonetti L, Junior JCD, Ceretta LB, et al. Gut and Vaginal Microbiota in the Endometriosis: Systematic Review and Meta-Analysis. Biomed Res Int. 2023;2023:2675966.
- ³⁰ Ventolini G, Vieira-Baptista P, De Seta F, Verstraelen H, Lonnee-Hoffmann R, Lev-Sagie A. The Vaginal Microbiome: IV. The Role of Vaginal Microbiome in Reproduction and in Gynecologic Cancers. J Low Genit Tract Dis. 1 janv 2022;26(1):93-8.
- ³¹ Wronding T, Vomstein K, Bosma EF, Mortensen B, Westh H, Heintz JE, Mollerup S, Petersen AM, Ensign LM, DeLong K et al. Antibiotic-free vaginal microbiota transplant with donor engraftment, dysbiosis resolution and live birth after recurrent pregnancy loss: a proof of concept case study. EClinicalMedicine 2023;
- ³² Molina NM, Sola-Leyva A, Saez-Lara MJ, Plaza-Diaz J, Tubić-Pavlović A, Romero B, et al. New Opportunities for Endometrial Health by Modifying Uterine Microbial Composition: Present or Future? Biomolecules. avr 2020;10(4):593.

ANNEXES

Critères d'inclusion et de non-inclusion étude ENDOMETAB :

Groupes « cas » :

Critères d'inclusion :

- Age > 18 ans et < 40 ans.
- Patiente ayant signé un consentement éclairé pour participer à la biocollection.

Critères de non-inclusion :

- Bilan retrouvant une origine autre qu'endométriale aux antécédents d'infertilité.

Le bilan réalisé dans le service pour les patientes en échec d'implantation comporte :

- la recherche d'endométrite chronique par biopsie d'endomètre
- les caryotypes de la patiente et de son conjoint
- une glycémie à jeun et des dosages sanguins de TSH, prolactine et vitamines B9 et B12
- un complément morphologique par hystéroskopie/échographie 3D/hystéroskopie
- un bilan immunologique et de thrombophilie à la recherche d'anticoagulant circulant de type lupique, d'anticorps anti-cardiolipines, d'anticorps antiB2glycoprotein, d'anticorps anti-TPO, d'anticorps anti thyroglobulines, d'une homocystéinémie

Ce bilan est conforme aux recommandations de l'ESHRE publiée en 2023 (ESHRE good practice recommendations on recurrent implantation failure). Tous ces examens étaient négatifs pour les patientes retenues pour l'étude.

Groupe « contrôle » :

Critères d'inclusion :

- Age > 18 ans et < 40 ans.
- Patiente ayant signé un consentement éclairé pour participer à l'étude ENDOMETAB.
- Patientes prises en charge en AMP et dont l'infertilité est liée à une origine masculine, c'est-à-dire dont le conjoint est porteur d'une oligoasthénotératospermie sévère ou d'une azoospermie ou d'une anéjaculation ou patientes ayant une indication de FIV pour antécédent de ligature tubaire.
- Patientes n'ayant pas d'antécédent particulier pouvant être à l'origine d'une infertilité.
- Patientes dont les examens complémentaires avant la prise en charge en AMP sont normaux: bilan hormonal (FSH, LH, oestradiol et AMH), compte de follicules antraux et hystérosalpingographie ou hystérosalpingographie.

Critères de non-inclusion :

- Mauvaise compréhension de la langue française.
- Majeures protégées par la loi :
 - Personnes privées de liberté par décision judiciaire ou administrative
 - Personnes faisant l'objet de soins psychiatriques
 - Personnes faisant l'objet d'une mesure de protection légale
 - Personnes hors d'état d'exprimer leur consentement
- Patientes non affiliées ou non bénéficiaires d'un régime de sécurité sociale
- Patientes en cours de participation à une autre recherche interventionnelle

Évaluation du microbiote endométrial dans les fausses-couches spontanées à répétition et les échecs d'implantation répétés après fécondation in-vitro.

RÉSUMÉ

Le recours aux techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) est en hausse, mais la prise en charge des échecs d'implantation répétés (EIR) et les fausses-couches spontanées répétées idiopathiques (FCSR-I) restent des défis. L'implantation embryonnaire, influencée par divers médiateurs moléculaires, peut échouer en cas de dysbiose génitale. Des études montrent que la dysbiose vaginale réduit les taux de grossesse et que le microbiote endométrial joue un rôle dans la fertilité. L'endométrite chronique pourrait être impliquée dans les FCSR et EIR. Cette nouvelle étude vise à déterminer si une signature microbienne endométriale affecte la réceptivité endométriale.

Cette étude cas-témoins historico-prospective compare les profils microbiens endométriaux de trois groupes de 30 patientes : contexte d'échecs d'implantation répétés (EIR), d'antécédents de fausses-couches à répétition (FCSR-I), et supposées fertiles. Des biopsies d'endomètre sont prélevées et analysées par séquençage haut débit (NGS) de la partie variable du gène 16S rRNA. Les analyses statistiques comparent la diversité alpha et bêta ainsi que l'abondance relative des phyla bactériens, avec un seuil de significativité à 0.05.

Les trois groupes étudiés sont comparables. Il n'a pas été identifié de différences de composition dans les 3 groupes d'intérêts. Mais ces analyses montrent une séparation en trois clusters, indépendant de notre cohorte, correspondant aux 3 espèces suivantes *Lactobacillus crispatus*, *iners*, et *L.gasseri*. L'absence de signature microbienne spécifique renforce l'hypothèse d'une origine embryonnaire des échecs d'implantation et des fausses-couches répétées. Dans ce contexte de FCSR et d'EIR, la réalisation d'une biopsie d'endomètre ayant uniquement pour but l'analyse du microbiote utérin ne semble à ce jour pas justifiée.

Mots-clés : Microbiote endométrial, échecs d'implantation répétés, fausses-couches spontanées répétées idiopathiques, dysbiose, signature endométriale

Endometrial microbiota and recurrent pregnancy loss or recurrent implantation failure

ABSTRACT

Repeated implantation failures (RIFs) and idiopathic repeated spontaneous miscarriages (RFSR-I) are challenges of reproductive medicine. Studies show that vaginal dysbiosis reduces pregnancy rates and that the endometrial microbiota plays a role in fertility. Chronic endometritis could be involved in FCSR and RIF. This new study aims to determine whether an endometrial microbiotic signature affects endometrial receptivity. We realize a historical-prospective case/control study comparing the endometrial microbial profiles of three groups of 30 patients: those with repeated implantation failure (RIE), with a history of recurrent miscarriage (FCSR-I) and presumed fertile.

Endometrial biopsies are taken and analyzed by high-throughput sequencing (NGS) of the variable part of the 16S rRNA bacterial gene. Statistical analyzes compare alpha and bêta diversity as well as the relative abundance of bacterial phyla, with a significance threshold of 0.05.

The three groups are comparable. Lactobacilli dominate the samples. There are no significative differences identified in the composition of the endometrial microbiota of the 3 groups of interest. But these analyses show a separation into three clusters, independent of our cohort, corresponding to the following 3 species *Lactobacillus crispatus*, *iners*, and *L.gasseri*. The lack of specific microbiotic signature reinforces the hypothesis of an embryonic origin of implantation failures and repeated miscarriages. In this context of RPL or RIF, performing an endometrial sample does not seem necessary.

Keywords : Endometrial microbiota, Repeated implantation failures, Idiopathic repeated spontaneous miscarriages, microbiotic signature.