



UNIVERSITE DE LILLE  
**FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG**  
Année : 2019

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Etude de l'influence de marqueurs inflammatoires et  
nutritionnels sur la récupération de la fonction ovarienne post-  
chimiothérapie**

Présentée et soutenue publiquement le 11 octobre 2019 à 14h  
au Pôle Formation  
**Par Isabelle LOISON**

---

**JURY**

**Présidente :**

**Madame le Professeur Myriam LABALETTE**

**Assesseurs :**

**Madame le Docteur Susanna SCHRAEN**

**Madame le Docteur Christine DECANTER**

**Directeur de Thèse :**

**Monsieur le Professeur Pascal PIGNY**

---



# **Avertissement**

La faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.



# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Voies de régulation de la folliculogénèse ovarienne</b> .....	<b>1</b>
a. Contrôle intra-ovarien de la folliculogénèse précoce .....	1
b. Voie centrale dans l'activation des follicules primordiaux : voie PI3K/Akt/mTORC1 .....	7
c. Rôle de la signalisation biomécanique et de la voie Hippo dans l'activation du follicule primordial.....	10
d. Rôle de l'angiogénèse et de la réponse immunitaire médiées par des facteurs de croissance sur la folliculogénèse .....	13
<b>2. Toxicité ovarienne causée par la chimiothérapie</b> .....	<b>17</b>
a. Généralités .....	17
b. Mécanismes de l'ovariotoxicité liée à la chimiothérapie.....	18
c. Prise en charge des patientes à l'Observatoire de la Fertilité du CHU de Lille .....	22
<b>3. Objectifs de l'étude</b> .....	<b>25</b>
<b>4. Marqueurs étudiés</b> .....	<b>28</b>
a. Marqueurs reflétant l'état inflammatoire .....	28
b. Marqueurs influençant l'état inflammatoire .....	31
c. Marqueurs reflétant le statut métabolique .....	41
<b>Matériel et méthode</b> .....	<b>45</b>
<b>1. Etude clinico-biologique</b> .....	<b>45</b>
a. Nombre de prélèvements par patiente .....	45
b. Effectif de la cohorte .....	45
c. Analyse statistique .....	49
d. Caractéristiques de la cohorte .....	49
<b>2. Méthode</b> .....	<b>51</b>
a. Nature des prélèvements.....	51
b. Techniques de dosage des différents marqueurs .....	52
<b>Résultats</b> .....	<b>59</b>
<b>1. Résultats analytiques des dosages de cytokines</b> .....	<b>59</b>
a. Contrôles de qualité interne .....	59
b. Profils de précision .....	59
c. Limites de la technologie Luminex.....	72
<b>2. Etude clinico-biologique</b> .....	<b>73</b>

a. Préambule .....	73
b. Paramètres inflammatoires.....	73
c. Paramètres nutritionnels .....	87
<b>Discussion.....</b>	<b>91</b>
<b>1. Influence du statut inflammatoire sur la récupération de la fonction ovarienne précoce post-chimiothérapie.....</b>	<b>91</b>
a. Interprétation de nos résultats par rapport aux données de la littérature .....	91
b. Implications physio-pathologiques .....	96
<b>2. Influence du statut nutritionnel sur la récupération de la fonction ovarienne précoce post-chimiothérapie.....</b>	<b>98</b>
<b>3. Perspectives.....</b>	<b>102</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>104</b>

# **Abréviations**

$\alpha$ 1-AT : alpha 1-Antitrypsine

ACI : Aménorrhée Chimio-Induite

Actine-F : Actine Filamenteuse

Actine-G : Actine Globulaire

AHA : American Heart Association

ALK : Activin-Like Kinase

AMH : Hormone Anti-Müllérienne

AMHRI / II : Récepteur à l'Hormone Anti-Müllérienne de type I / II

ASCOT : Autologous Stem Cell Ovarian Transplantation

BIRC : Baculoviral Inhibitors of apoptosis Repeat Containing

BMI : Body Mass Index

BMP 15 : Bone Morphogenetic Protein 15

CBPG : Centre de Biologie Pathologie Génétique

CDC : Centers for Disease Control and Prevention

CDCE : Centre De Conservation des Echantillons

CFA : Compte Folliculaire Antral

CG : Cellules de la Granulosa

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

COS : Controlled Ovarian Stimulation

CQI : Contrôle de Qualité Interne

CRP : Protéine C Réactive

CRP<sub>us</sub> : Protéine C Réactive ultra-sensible

CSDMO : Cellules Souches Dérivées de la Moëlle Osseuse

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CT : Chimiothérapie

CV : Coefficient de variation

Cy : Cyclophosphamide

E2 : Œstradiol

FGF 2 : Fibroblast Growth Factor 2

FIV : Fécondation In Vitro

FOXO3a : Forkhead box protein O 3a

FSH : Follicle Stimulating Hormone

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GDF9 : Growth Differentiation Factor 9

GnRH : Gonadotrophin-Releasing Hormone

GPCR : Récepteurs couplés aux protéines G

hAECs : Cellules Epithéliales Amniotiques Humaines

HHG : (axe) Hypothalamo-Hypophyso-Gonadique

HLOQ : High Limit Of Quantification

ICSI : IntraCyttoplasmic Sperm Injection

IFN : Interféron

IGF-1 : Insulin Growth Factor 1

IL : Interleukine

IL1-RI : Récepteur de type I de l'Interleukine-1

IL1-RI AcP : Protéine Accessoire du Récepteur de type I de l'Interleukine-1

IL1-Ra : Antagoniste du Récepteur de l'Interleukine-1

IL-6R : Récepteur de l'Interleukine-6

IL6-sR : Récepteur soluble de l'Interleukine-6

IOP : Insuffisance Ovarienne Prématuurée

JAK : Janus Kinase



JNK 1/2 : c-Jun N-terminal kinase 1/2

LATS 1/2 : Large Tumor-Suppressor homolog 1/2

LepR : Récepteur à la Leptine

LGI : Low Grade Inflammation

LH : Luteinizing Hormone

LLOQ : Low Limit Of Quantification

LPS : Lipopolysaccharide

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

MCP 1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1

MCV : Maladies Cardio-Vasculaires

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

MFI : Mean Fluorescence Intensity

MIF : Macrophage Inhibitory Factor

MMP : Métalloprotéinases Matricielles

MST 1/2 : Macrophage Stimulating 1/2

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

NF-kB : Nuclear Factor-kappa B

NK : Natural Killer

NLR : Récepteur de type NOD = Nucleotide Oligomerization Domain receptors

PCOS : Polycystic Ovarian Syndrome

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PDK-1 : Phosphatidyl Inositol-Dependent Kinase 1

PE : Phycoérythrine

PI3K : Phosphatidyl Inositol 4, 5 biphosphate 3-Kinase

PIP2 : Phosphatidyl Inositol 4, 5 biPhosphate

PIP3 : Phosphatidyl Inositol 3, 4, 5 triPhosphate

PMA : Procréation Médicalement Assistée

PNN : Polynucléaires Neutrophiles

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10

ROCK : Rho-associated protein Kinase

RPS6 : Protéine Ribosomale S6

RSK : Récepteurs à activité Sérine/thréonine Kinase

RTK : Récepteurs à activité Tyrosine Kinase

SAV 1 : Protein Salvador homolog 1

SEM : Standard Error of the Mean

SBP : Sex-Binding-Protein

SDF-1 : Stromal cell-Derived Factor 1

STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3

TACE : Tumor necrosis factor-Alpha-Converting Enzyme

TAZ : Transcriptional coActivator with PDZ-binding motif

TEA : Transcriptionnal Enhancer Activator

TGF  $\beta$  : Transforming Growth Factor Bêta

Th : T helper lymphocytes

THSP 1 : Thrombospondine 1

TLR : Toll - Like Receptors

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor Alpha

TNFR I/II : Récepteur de type I/II du Tumor Necrosis Factor

TRADD : TNF Receptor-Associated Death Domain

TRAF : TNF Receptor-Associated Factor

TSC 1/2 : Tuberous Sclerosis Complex 1 et 2

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

YAP : Yes – Associated Protein





# Introduction

## 1. Voies de régulation de la folliculogénèse ovarienne

### a. Contrôle intra-ovarien de la folliculogénèse précoce

#### i. **Recrutement folliculaire**

Les ovaires ont un pool fixe non renouvelable de follicules primordiaux à la naissance constituant la réserve ovarienne (1). Les follicules primordiaux sont des ovocytes bloqués en prophase I entourés d'une seule couche de cellules de la granulosa (CG) squameuses et ils peuvent rester quiescents dans les ovaires pendant des années avant d'être recrutés (2). Le **recrutement initial** désigne l'activation des follicules primordiaux quiescents et le développement des follicules primaires et secondaires jusqu'au stade antral précoce (cf Figure n°1), (3), (4). Il est bien connu que le développement folliculaire du stade antral précoce au stade pré-ovulatoire puis ovulatoire est régulé majoritairement par la FSH (Follicle Stimulating Hormone) et ce processus est appelé **recrutement cyclique**. Le recrutement des follicules primordiaux est régulé par des mécanismes hautement contrôlés qui assurent une balance durable entre le pool de follicules quiescents et le pool de follicules en croissance, générant un ovocyte sain mature sélectionné chaque mois, tout en prévenant l'épuisement prématuré de la réserve ovarienne (2), et c'est cette phase de la folliculogénèse que nous allons aborder plus en détail.

Les récepteurs à la FSH sont exprimés dans les follicules des stades primaires aux stades tardifs. Le développement des follicules peut être divisé en stade **dépendant** des gonadotrophines (stade antral) et en stade **sensible** aux gonadotrophines (stade pré-antral). En effet, en l'absence de FSH les follicules peuvent quand même se développer jusqu'au

stade pré-antral, cependant, en présence de gonadotrophine, leur croissance est améliorée (3).

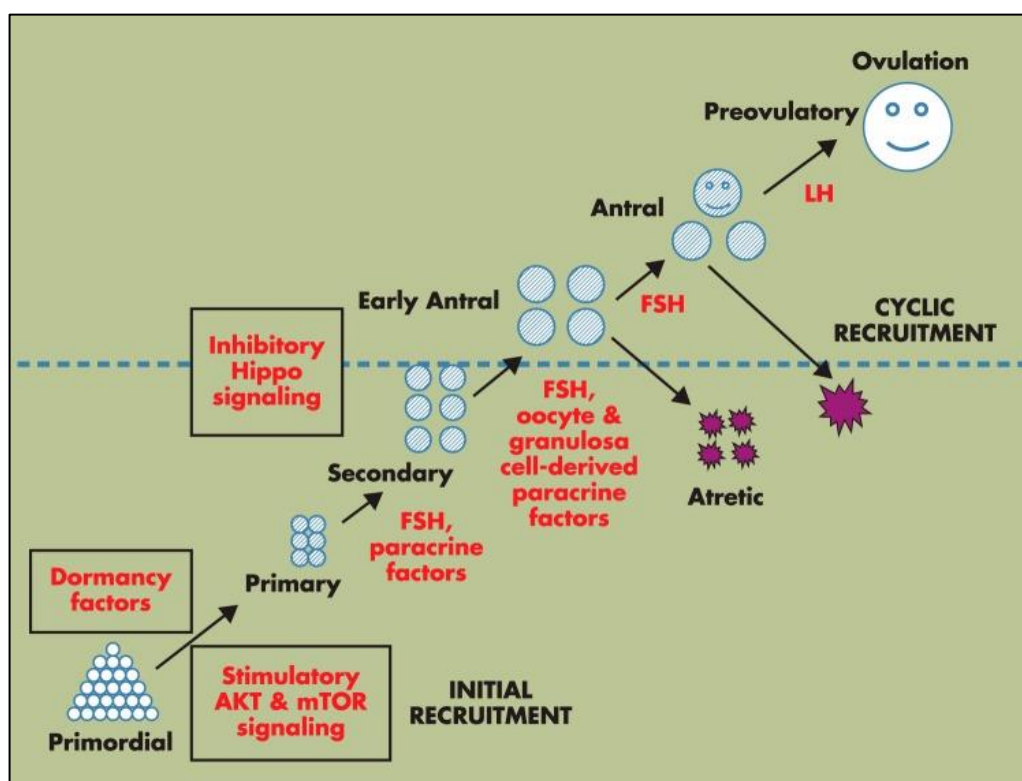


Figure n°1 : Régulation hormonale de la folliculogénèse. D'après Hsueh AJW et al. Endocrine Reviews. 2015. (3)

Par ailleurs, l'ovocyte sécrète des facteurs paracrines capables de promouvoir la prolifération et la différenciation des cellules somatiques environnantes. Au moins deux facteurs dérivés des ovocytes favorisent la croissance des CG : **GDF9** (Growth Differentiation Factor 9) et **BMP15** (Bone Morphogenetic Protein-15), (3).

En plus des facteurs ovocytaires, un grand groupe de **ligands peptidiques/protéiques** (cf Tableau n°1) sont sécrétés par les **CG** et régulent la croissance folliculaire pré-antrale. Ces ligands agissent via de nombreuses voies de signalisation intracellulaires distinctes, activées par des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase (RSK), et des récepteurs couplés aux protéines

G (GPCR). Les rôles physiologiques de la plupart des ligands impliqués dans le développement folliculaire sont plus ou moins clairs (3).

**Tableau n°1 : Facteurs peptidiques/protéiques produits par les CG et leurs récepteurs.**  
D'après Hsueh AJW *et al.* Endocrine Reviews. 2015. (3)

Ligands produits par les CG	Récepteurs
IGF-1, KGF, VEGF, FGF-2, FGF-10	RTK
Activines, BMP6, AMH	RSK (types I et II)
PACAP, VIP	GPCR
CNP	NPRB
CCN2/CTGF	Intégrines

## ii. Facteurs activateurs

**GDF9** et **BMP15** sont des facteurs ovocytaires capables de stimuler le développement folliculaire. Ils appartiennent à la superfamille du **TGF-β** (Transforming Growth Factor Bêta) et se lient à des **RSK**. Les deux facteurs se lient au récepteur BMP de type II et recrutent les récepteurs de type I [ALK (Activin-Like Kinase) 5 pour GDF9 et ALK 6 pour BMP15] afin de réguler les protéines **SMAD** (facteurs de transcription) en aval dans les CG (3). *In vivo*, le traitement par **GDF9** favorise le développement des follicules primordiaux jusqu'au stade primaire et au stade de petits follicules pré-antraux. GDF9 a aussi des actions anti-apoptotiques durant le développement folliculaire antral précoce . **BMP15** est un gène paralogue de GDF9. BMP15 comme GDF9, est exprimé dans les ovocytes, et est un puissant stimulateur de la prolifération des CG (3).

L'**activine** est un membre de la superfamille du TGF-β. Il existe trois isoformes d'activine : A, B et AB en fonction de l'association des sous-unités βA et βB, l'**activine A** étant l'isoforme prédominante. L'activine est un acteur important de la folliculogénèse humaine en maintenant les interactions CG -ovocyte. Elle est exprimée par les CG et les

ovocytes et elle est connue pour être impliquée dans le développement du follicule pré-antral. L'activine **stimule** la libération de **FSH** par l'hypophyse alors que dans l'ovaire, elle favorise la croissance folliculaire en augmentant la prolifération des CG et en facilitant la formation d'antrum (5). Il a été montré que chez l'Homme, des follicules pré-antraux cultivés en présence d'Activine A atteignaient un diamètre supérieur à celui du groupe contrôle au bout de 4 jours de culture individuelle, et parmi ceux-ci, certains présentaient une morphologie normale avec des ovocytes intacts et développaient une cavité antrale (5), (6).

L'**IGF-1** (Insulin Growth Factor 1), produit par les CG, favorise la croissance des CG et des cellules de la thèque (CT), et permet aux gonadotrophines de stimuler la stéroïdogénèse chez l'Homme et la souris (4). L'IGF-1 active la croissance des follicules primordiaux ovins via la voie de signalisation **PI3K** (Phosphatidyl Inositol 4, 5 biphosphate 3-Kinase) / **Akt** (protein kinase B), (7).

L'**insuline** est un régulateur majeur de la prolifération cellulaire, la différenciation, et la survie des follicules ovariens en culture (8). Elle est considérée comme le facteur de croissance **le plus important** pour les CG et les CT dans les follicules en développement. Nath *et al* ont évalué l'effet de la supplémentation d'insuline à 3 concentrations différentes (6, 8 et 10 µg/ml) sur la croissance folliculaire et ovocytaire *in vitro* chez la **souris**. La croissance folliculaire et la maturation ovocytaire ont été suivies par des critères histologiques et par l'étude de marqueurs de maturation ovocytaire (GDF9). La supplémentation en insuline aux concentrations les plus élevées (8 et 10 µg/ml) améliorerait significativement le taux de formation d'antrum. Cependant aucune différence significative n'était observée entre les trois niveaux de concentration s'agissant du taux de survie folliculaire, du taux d'ovulation et du pourcentage d'ovocytes matures en Métaphase II (8).



L'insuline est ajoutée au milieu de culture lors des premières étapes de la croissance *in vitro* de **follicules humains** (2), (5), (6). Dans le cortex ovarien humain en culture, l'insuline, seule ou en association avec IGF-1, augmente le pourcentage de follicules en transition vers le stade primaire (9). L'insuline agit via son récepteur et les protéines substrats du récepteur et peut **activer la voie de signalisation PI3K-Akt** qui régule la folliculogénèse. En effet, dans un modèle **murin** d'obésité, il a été observé une augmentation de l'expression ovarienne des ARNm de membres de la signalisation du récepteur de l'insuline, ainsi que de membres de la voie Kit ligand/c-Kit/PI3K/Akt/Foxo3a par rapport aux souris contrôles. L'obésité était associée à une augmentation d'une forme phosphorylée de protéine substrat du récepteur à l'insuline (pIRS1-*Ser302*) et de la forme active d'Akt phosphorylée sur la thréonine 308 (p-Akt-*Thr308*) (9).

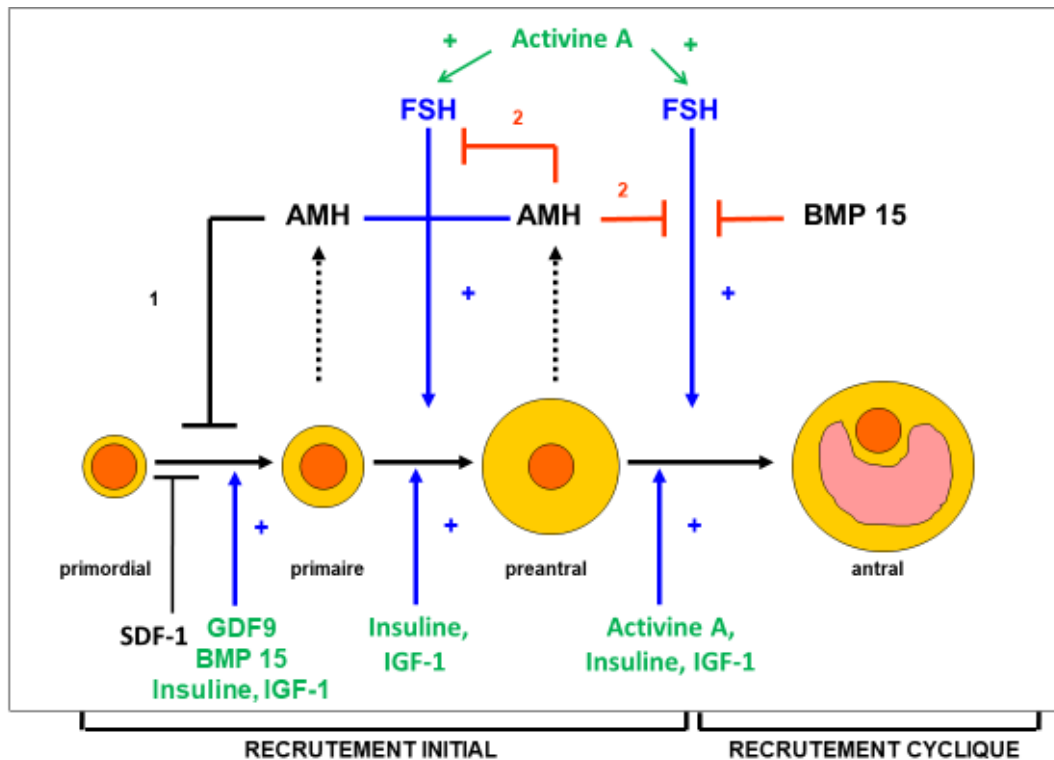
Chez les primates, les **androgènes** stimulent la croissance et la survie des follicules aux stades précoces. En effet, ils favorisent la prolifération des CG en induisant sur ces cellules l'expression du récepteur à la FSH (10), (11).

### iii. Facteurs inhibiteurs

L'**AMH** (Hormone Anti-Müllérienne) est une glycoprotéine appartenant à la famille du TGF- $\beta$  agissant sur la croissance et la différenciation tissulaire (12), (13). L'expression d'AMH est négligeable dans les follicules primordiaux, faible dans les CG des follicules primaires, et elle est plus élevée dans les **CG des follicules pré-antraux**/secondaires et des **petits follicules antraux** de moins de 8 mm de diamètre. Dans les plus grands follicules antraux, l'expression d'AMH décline graduellement (3), (14). L'AMH agit sur le recrutement initial en **inhibant l'activation des follicules primordiaux** (12), (13). Par ailleurs, elle diminue la croissance folliculaire lors du recrutement cyclique par **diminution de la sensibilité du follicule à la FSH**. La sécrétion d'AMH est fortement diminuée dans

les follicules atrétiqes, peut-être pour permettre le développement d'une « vague folliculaire ». La réponse à l'AMH serait d'une part follicule et espèce-spécifique et d'autre part dose-dépendante. L'AMH se lie à son récepteur spécifique de type II (AMHR2) qui recrute le récepteur de type I (AMHR1) conduisant au recrutement des protéines SMAD (13). La concentration sérique d'AMH à J3 du cycle menstruel est très fortement corrélée avec le compte de follicules antraux (CFA) évalué par échographie pelvienne et elle constitue un **marqueur de la réserve ovarienne** (12).

**SDF-1** (Stromal cell-Derived Factor-1) est un membre de la famille CXC des chémokines (aussi connu sous le nom de CXCL12) et sa production a été mise en évidence dans les CG du liquide folliculaire de patientes suivies pour une FIV (Fécondation In Vitro), (15). Il a été démontré que SDF-1 maintient les follicules primordiaux dans un état de **quiescence**. Des travaux suggèrent que SDF-1 inhibe l'activation folliculaire durant la période périnatale chez la souris de manière autocrine (13).



**Figure n°2 : Représentation schématique des facteurs régulant le recrutement folliculaire initial et cyclique.** Adapté d'après McGee EA *et al*, Endocrine Reviews, 2000 (16) ; Durlinger A *et al*, Reprod Camb Engl, 2002.

b. Voie centrale dans l'activation des follicules primordiaux : voie

PI3K/Akt/mTORC1

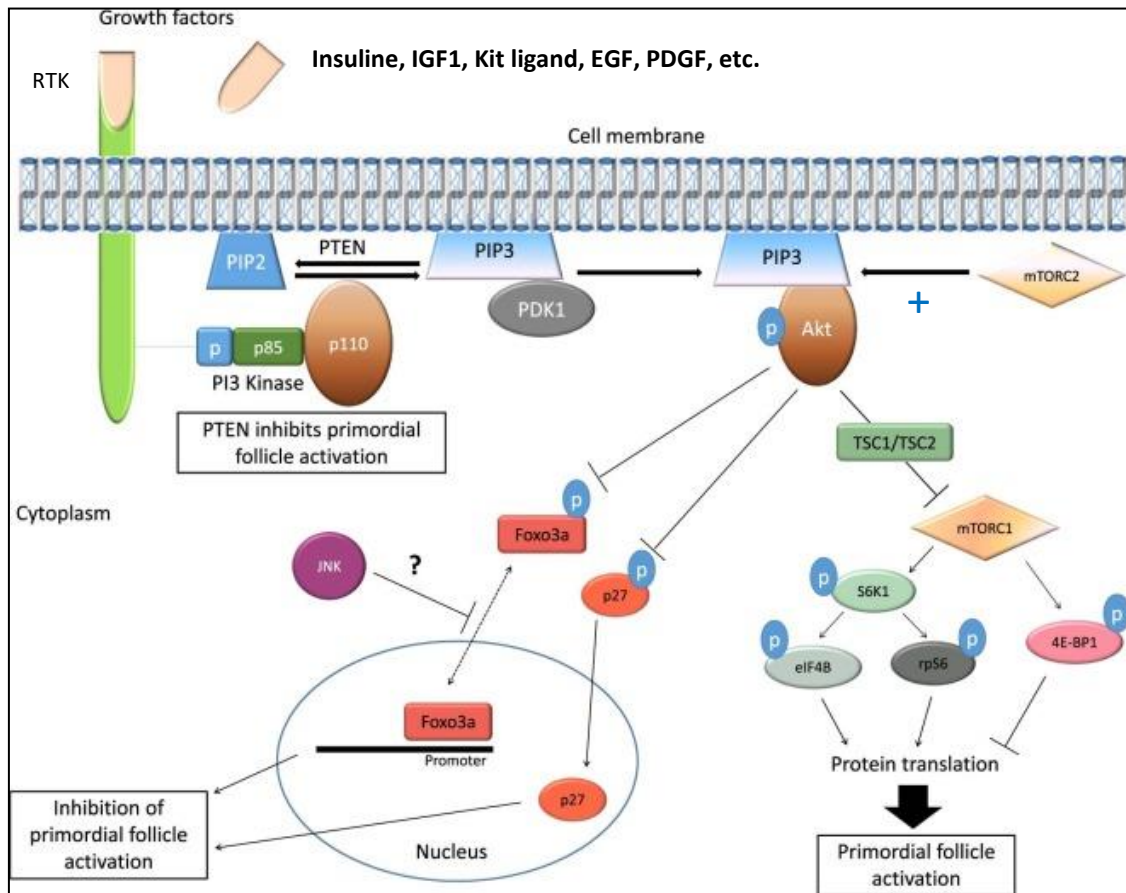
i. **Rôle de la voie PI3K/Akt**

La voie PI3K régule la **prolifération cellulaire, la croissance et la survie** dans l'ovaire humain.

Suite à la fixation d'un **facteur de croissance** [kit ligand, IGF-1, insuline, PDGF (Platelet Derived Growth Factor), etc] sur son RTK, la phosphorylation de la région intracellulaire du récepteur stimule l'activité de la **PI3K** conduisant à la conversion de **PIP2** (Phosphatidyl Inositol-4,5-biPhosphate) en **PIP3** (Phosphatidyl Inositol - 3, 4, 5 - triPhosphate). PIP3, en retour, recrute et active la kinase **PDK1** (Phosphatidyl Inositol-

Dependent Kinase 1) suivie de l'activation de la protéine kinase **Akt** (2). Le facteur de transcription **FOXO3a** (Forkhead box protein O 3a) est un régulateur essentiel de la **quiescence folliculaire** lorsqu'il est présent au niveau du **noyau**. La protéine Akt activée phosphoryle FOXO3a, provoquant son expulsion du noyau. La localisation **cytoplasmique** de FOXO3a sous sa forme phosphorylée entraîne l'**activation des follicules primordiaux** (3), (4), (13). La protéine **p27** (régulateur du cycle cellulaire) est un autre facteur **inhibant l'activation des follicules primordiaux** lorsqu'elle se trouve sous sa forme non phosphorylée dans le noyau. Akt phosphoryle p27, entraînant sa localisation cytoplasmique à l'état inactif (13). L'enzyme inhibitrice **PTEN** (Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10) **régule négativement la voie PI3K** en déphosphorylant PIP3 et en le reconvertissant en PIP2. PTEN est donc un inhibiteur de l'activation des follicules primordiaux (cf Figure n°3), (2), (3).

Par ailleurs, il a été montré un lien entre une cytokine pro-inflammatoire, **l'interleukine-6 (IL-6)**, et la voie PI3K/Akt. L'IL-6 induit une réponse pro-inflammatoire dans les cellules endothéliales vasculaires humaines via l'induction de l'expression de protéines chémo-attractantes comme MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1). Dans ces cellules, la signalisation de l'IL-6 utilise les voies JAK (Janus Kinase) - STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) et **PI3K/Akt**. On peut extrapoler que dans l'ovaire, la signalisation de l'IL-6 s'effectue également par l'activation de la voie PI3K/Akt, or comme nous l'avons vu, cette voie régule l'activation des follicules primordiaux (17).



**Figure n° 3 : Voies de signalisation PI3K/Akt/mTOR régulant l'activation du follicule primordial.** D'après Bertoldo MJ *et al.* Reproductive BioMedicine Online, 2018. (13)

### i. Rôle du complexe mTOR

**mTOR** (mammalian Target Of Rapamycin) est une protéine sérine/thréonine kinase qui forme la sous-unité catalytique de deux complexes protéiques, mTORC1 et mTORC2. Dans les cellules eucaryotes, **mTORC1** contrôle la **balance entre anabolisme et catabolisme** en réponse aux **conditions environnementales**. mTORC1 favorise la synthèse de protéines, de lipides, de nucléotides, et influence le métabolisme du glucose. Tandis que mTORC1 régule la croissance cellulaire et le métabolisme, **mTORC2** contrôle plutôt la prolifération et la survie. L'anabolisme accru dépendant de mTORC1 ne devrait se produire qu'en présence de signaux endocriniens favorables à la croissance (insuline), ainsi que d'éléments énergétiques suffisants à la synthèse macromoléculaire (charge énergétique élevée). Chez les mammifères, ces apports sont en grande partie dépendants de la

**diététique**, de telle manière que **mTORC1** est **activé après la prise alimentaire** pour promouvoir la croissance et le stockage d'énergie dans les tissus comme le foie et le muscle, mais est **inhibé durant le jeûne** afin de préserver les ressources limitées (18).

**mTORC1** participe à l'**activation du follicule primordial**. En effet, mTORC1 est régulé négativement par **TSC1/2** (Tuberous Sclerosis Complex 1 et 2). La phosphorylation et l'inactivation de TSC par **Akt** conduit à l'activation de mTORC1 (13) puis à la phosphorylation et à l'activation de la protéine ribosomale S6 (**RPS6**) en aval, possédant un effet stimulant sur l'activation du follicule primordial (2). De nombreux facteurs vont converger vers TSC1 ou TSC2 et provoquer l'activation de la voie mTORC1. Citons les facteurs de croissance insuline / IGF-1 ou la cytokine pro-inflammatoire TNF $\alpha$  (18). L'**everolimus**, un analogue de la rapamycine, est un **inhibiteur de mTORC1** et participe ainsi au maintien de la quiescence folliculaire (2),(4).

**mTORC2** est également activé par la voie **insuline/PI3K**. En retour, mTORC2 phosphoryle et active Akt (18).

c. Rôle de la signalisation biomécanique et de la voie Hippo dans l'activation du follicule primordial

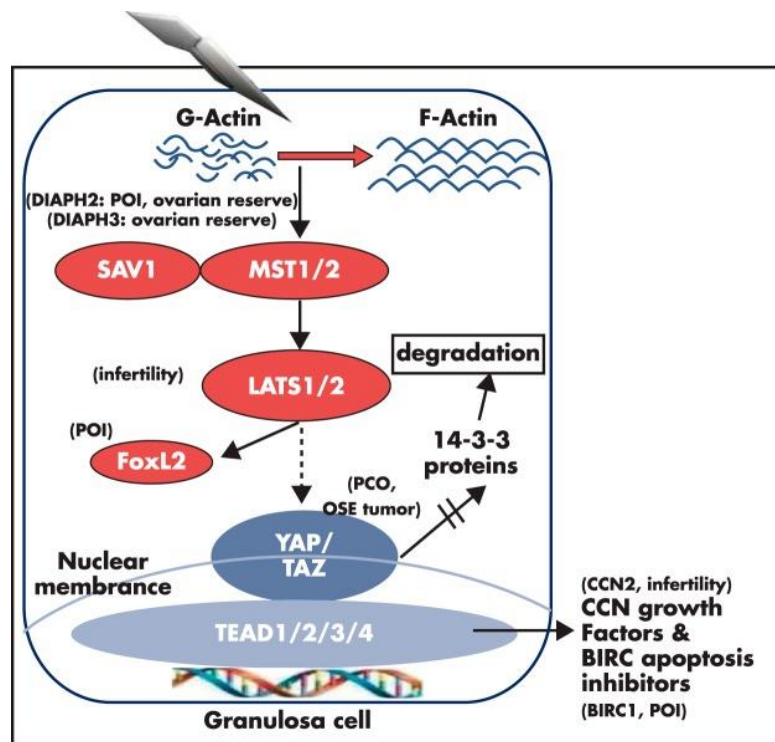
On appelle **signalisation biomécanique** ou mécano transduction le processus via lequel des stimuli mécaniques sont transcrits en signaux biochimiques activant l'expression de gènes ou la signalisation cellulaire. Il semble que cette signalisation joue un rôle essentiel au cours des différents stades folliculaires. Des études chez les primates et la souris *in vitro* soutiennent le concept que le **gradient de rigidité ovarienne** peut à la fois limiter la croissance folliculaire pour maintenir la quiescence (en effet les follicules primordiaux sont localisés principalement dans le cortex ovarien, plus rigide), et

inversement faciliter l'activation, la maturation folliculaire et la production d'hormones (les follicules pré-antraux se situent dans la région médullaire moins rigide), (4).

La voie de signalisation **Hippo** joue un rôle essentiel dans le contrôle de la taille de l'organe. Dans l'ovaire, elle **inhibe la croissance folliculaire**. Contrairement à de nombreuses voies de signalisation induites par des ligands extracellulaires, la voie Hippo n'a pas de ligands et de récepteurs extracellulaires dédiés mais est plutôt régulée en amont par un réseau de composants impliqués dans la régulation de l'adhésion, de la forme et de la polarité cellulaire. L'adhésion cellulaire, le maintien de la forme cellulaire et la locomotion sont médiés par des changements rapides dans la **polymérisation de l'actine globulaire** (actine-G) **en actine filamenteuse** (actine-F), (3). La polymérisation de l'actine-G en actine-F entraîne une modification des forces biomécaniques qui jouent donc un rôle clé dans l'initiation et la progression de la folliculogénèse (cf Figure n°4), (4).

Chez les humains et chez la souris, la perception d'un **stress mécanique interne élevé** par les cellules folliculaires entraîne la phosphorylation de **YAP** (Yes-Associated Protein) et **TAZ** (Transcriptional coActivator with PDZ – binding motif) par la Rho GTPase et ROCK (Rho-associated protein kinase) conduisant à leur séquestration et leur dégradation cytoplasmique par les protéines 14-3-3, empêchant leur translocation nucléaire. La voie Hippo fait intervenir des inhibiteurs de la croissance **MST1/2** (Macrophage Stimulating 1/2), **SAV1** (Protein Salvador homolog 1) et **LATS1/2** (Large Tumor-Suppressor homolog 1/2). De plus, la translocation nucléaire de YAP est nécessaire à la transcription de facteurs de croissance **CCN** et des protéines **BIRC** (Baculoviral Inhibitors of apoptosis Repeat Containing) (2), (3), (4). Ainsi, la voie **Hippo** maintient la **quiescence folliculaire**.

Inversement, la **dérégulation** de la voie **Hippo** par fragmentation du tissu ovarien conduit à l'**activation du follicule primordial**. Cette perturbation de la voie Hippo est liée à la **polymérisation d'actine-G en actine-F** (4). Quand la signalisation Hippo est perturbée, YAP et TAZ interagissent dans le noyau avec les protéines **TEAD**, des facteurs de transcription contenant le domaine de liaison à l'ADN TEA (Transcriptional Enhancer Activator), pour augmenter l'expression de facteurs de croissance **CCN** en aval, et des protéines inhibitrices de l'apoptose **BIRC**. Ces protéines CCN et BIRC, en retour, stimulent la **croissance cellulaire**, la survie et la prolifération (2), (3).



*Figure n°4 : La polymérisation de l'actine perturbe la voie de signalisation Hippo et favorise les actions nucléaires de YAP. D'après Hsueh AJW et al. Endocrine Reviews, 2015. (3)*

La **cryopréservation ovarienne** et l'**auto transplantation** en vue de restaurer la fertilité chez les femmes qui reçoivent des traitements anti-cancéreux stérilisants ont été substantiellement améliorés par la **fragmentation** des ovaires avant la transplantation. Ce progrès peut maintenant être expliqué par la dérégulation de la voie Hippo induite par la fragmentation ovarienne qui favorise la croissance folliculaire (3).



La connaissance des voies de signalisation contrôlant la folliculogénèse précoce est essentielle pour le développement de systèmes de culture *in vitro*, dont le défaut à l'heure actuelle réside dans une activation précoce et non contrôlée du pool de follicules primordiaux (13). L'amélioration des systèmes de culture *in vitro* a pour objectif d'obtenir une activation et une croissance progressive des follicules, afin d'obtenir une population d'ovocytes de bonne qualité. Cette technique offrirait d'une part une alternative à la transplantation autologue de tissu ovarien cryopréservé, outrepassant le risque de réintroduction de cellules tumorales chez les patientes bénéficiant d'une préservation de la fertilité en contexte néoplasique (13), et d'autre part représenterait une alternative au don d'ovocytes en Procréation Médicalement Assistée (PMA) pour les patientes ayant une mauvaise réserve ovarienne et ne répondant pas à la stimulation ovarienne contrôlée (COS), (5).

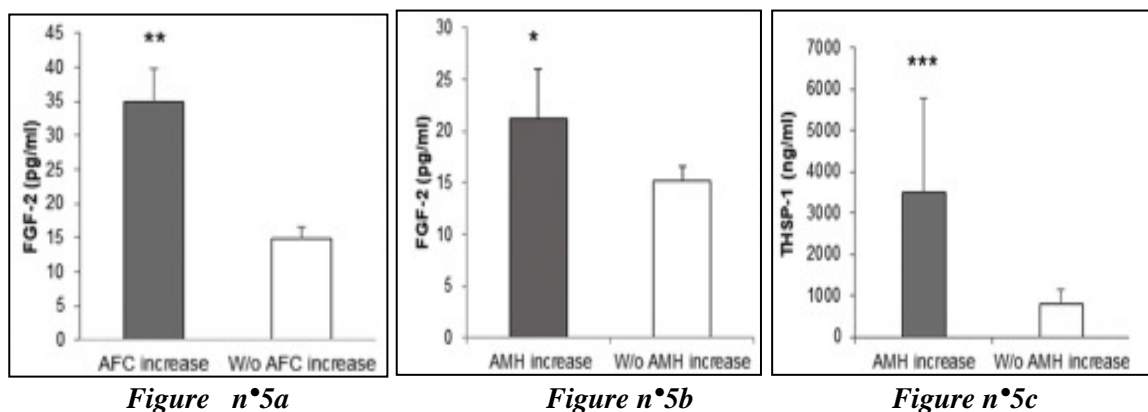
d. Rôle de l'angiogénèse et de la réponse immunitaire médiées par des facteurs de croissance sur la folliculogénèse

L'environnement local (« **niche de croissance ovarienne** ») joue un rôle fondamental dans l'**activation** et la **croissance des follicules primordiaux** avec l'intervention de mécanismes **paracrines et autocrines**. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) adultes ont la capacité de produire une variété de cytokines, chémokines et facteurs de croissance, pouvant avoir des propriétés de réparation tissulaire, et certains de ces facteurs solubles sont impliqués dans la croissance folliculaire, la signalisation des cellules souches, l'angiogénèse, la viabilité cellulaire et la réponse ovarienne à la COS (19).

Ces propriétés des cellules souches ont été mises à profit dans une étude menée par Herraiz *et al* (19), où 17 patientes qualifiées de mauvaises répondeuses ont reçu un

traitement par G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) durant 5 jours dans le but de mobiliser des **cellules souches dérivées de la moelle osseuse** (CSDMO) dans le sang périphérique. Une quantité définie de CSDMO prélevée par aphérèse a été réinjectée dans un ovaire par cathétérisme de l'artère ovarienne (**Autologous Stem Cell Ovarian Transplantation** : ASCOT), et l'ovaire controlatéral était désigné comme contrôle. Les auteurs ont jugé principalement l'efficacité de cette technique en évaluant d'une part deux paramètres reflétant la réserve ovarienne, à savoir le **CFA** et la concentration sérique d'**AMH** au cours des 5 mois suivant le cathétérisme intra-artériel, et d'autre part, le nombre d'**ovocytes en métaphase II** obtenus après COS chez 15 patientes. Les paramètres de la réserve ovarienne ont été comparés avec la concentration dans les échantillons d'aphérèse de 4 facteurs de croissance libérés par les CSDMO : **FGF-2** (Fibroblast Growth Factor 2), **PDGF-BB** (Platelet Derived Growth Factor-BB), **THSP-1** (Thrombospondine 1) et **IGF-1** avant et après l'ASCOT (19).

Une réponse positive à l'ASCOT a été définie comme une augmentation du CFA d'au moins trois follicules, et/ou deux augmentations successives des taux d'AMH lors du suivi des patientes. Selon ces critères, la réserve ovarienne s'est améliorée chez 81.3% des patientes dans le mois suivant le traitement. Il a été montré de façon intéressante que les concentrations plasmatiques de **FGF-2** étaient significativement **plus élevées** chez les patientes avec une **réponse positive à l'ASCOT** que ce soit en terme de CFA ( $p = 0.004$  ; cf Figure n°5a), ou de concentrations sériques d'AMH ( $p = 0.03$  ; cf Figure n°5b). Également, les concentrations de **THSP-1** étaient significativement **plus élevées** chez les patientes avec une réponse AMH positive ( $p = 0.049$  ; cf Figure n°5c) ou chez les patientes présentant une amélioration du CFA ( $r = 0.98$ ,  $p < 0.01$ ). Aucune association statistiquement significative n'a été identifiée entre les marqueurs de la réserve ovarienne et l'IGF-1 ou le PDGF-BB.



**Figure n°5 a/b/c : Taux plasmatiques de FGF-2 et de THSP-1 (obtenus après centrifugation des échantillons d'aphérèse) selon l'augmentation ou non du CFA et des taux sériques d'AMH après ASCOT. D'après Herraiz S *et al.* Fertility and Sterility, 2018. (19)**

Cet effet **paracrine** de **facteurs de croissance** solubles sécrétés par les **CSDMO** jouerait un rôle clé dans le fonctionnement de la niche ovarienne. La protéine **FGF-2** et son récepteur sont exprimés dans les follicules humains précoces et impactent la production d'œstrogènes. De plus, la surexpression de FGF-2 est associée à l'amélioration du développement folliculaire et à la **néoangiogenèse** qui maintient la croissance des follicules dans l'ovaire. La **THSP-1** est également un important médiateur de l'**angiogenèse** (propriétés anti-angiogéniques) et de la folliculogenèse ovarienne, et sa surexpression est associée aux effets régénératifs induits par la thérapie cellulaire CD133 dans un modèle animal de maladie de l'endomètre (20). L'amélioration du CFA observée dans les deux ovaires chez plusieurs patientes après mobilisation de CSDMO pourrait donc être expliquée par l'augmentation de la concentration intra-ovarienne de ces deux molécules.

Les auteurs émettent l'hypothèse que chez ces patientes mauvaises répondeuses, l'injection de CSDMO a permis d'établir un **réseau vasculaire adéquat**, grâce aux effets inducteurs de la néoangiogenèse du FGF-2 et de la THSP-1, permettant à des petits follicules pré-antraux de se développer et de générer un follicule mature. La restauration d'un débit sanguin adéquat répondrait aux besoins physiologiques des CG en vue d'une prolifération et d'une différenciation rapide. Cette étude offre de nouvelles perspectives

d'**utilisation de cytokines** et de **facteurs de croissance plasmatiques** pour induire la croissance folliculaire ou pour la prédire.

Dans un modèle **murin d'insuffisance ovarienne prématurée** (IOP) induit par la **chimiothérapie** (CT), (busulfan et cyclophosphamide), Zhang *et al* ont étudié les effets paracrines des **cellules épithéliales amniotiques humaines** (hAECs) sur les lésions ovariennes induites par la CT. Ils ont constitué un milieu enrichi en hAECs qui a été injecté dans un des ovaires de souris traitées par CT, l'autre ovaire étant utilisé comme contrôle. Les auteurs ont observé dans **l'ovaire traité** la présence de **follicules sains pré-antraux et antraux**, alors que dans l'ovaire contrôle non traité, aucun follicule secondaire ou mature n'était visible. Afin de mieux comprendre les effets biologiques du milieu enrichi en hAECs, un panel de 507 cytokines humaines a été dosé dans le milieu injecté, et **109 cytokines** ont été détectées. Ces cytokines sont connues pour leur implication dans la régulation de l'apoptose, la réponse immunitaire, l'angiogenèse et la régulation du cycle cellulaire, et elles semblent jouer des rôles clés dans la récupération de la fonction ovarienne médiée par les hAECs. Les concentrations de **THSP-1**, de **MIF** (Macrophage Inhibitory Factor) et d'interleukine-2 (**IL-2**) étaient particulièrement élevées dans le milieu enrichi en hAECs comparé au milieu contrôle (facteur 164.26 à 5856.68). Les concentrations d'**IL-6**, d'**IL-8**, d'**IL-10**, d'**IL-1 $\alpha$**  et de **TNF- $\alpha$**  étaient également augmentées (facteur 3.29 à 10.62). Cette étude suggère que les hAECs sécrètent des cytokines qui améliorent d'une manière paracrine le microenvironnement ovarien lésé par la CT en **inhibant l'apoptose des CG** induite par la CT, en favorisant l'**angiogenèse** et en régulant le développement folliculaire, permettant ainsi la **récupération de la fonction ovarienne après CT**. Un autre mécanisme pouvant expliquer l'effet bénéfique des hAECs est leur propre **différenciation en CG** exprimant le récepteur à la FSH et participant au développement folliculaire (21).

## 2. Toxicité ovarienne causée par la chimiothérapie

### a. Généralités

Les protocoles de CT, en particulier ceux contenant des agents alkylants, sont toxiques pour les follicules ovariens à tous les stades de leur développement (12), (14).

Le degré de toxicité ovarienne dépend de l'**âge** de la patiente, de la **réserve ovarienne** préexistante, du **type de traitement** et de la **dose reçue** (12). Cliniquement, cette déplétion folliculaire se traduit par un **arrêt des menstruations** qui peut être transitoire ou permanent, conduisant dans ce dernier cas à l'IOP et/ou l'infertilité (12). Biologiquement, elle se manifeste par une diminution voire un **effondrement du taux d'AMH** sérique, suivi ou non d'une ré-ascension en post-CT. La reprise de l'activité menstruelle après la CT est un marqueur tardif de la reprise de la croissance folliculaire (14). L'**IOP** se définit par la survenue d'une aménorrhée de plus de quatre mois avant l'âge de 40 ans, des concentrations sériques d'œstradiol (E2) diminuées, et des taux de FSH sérique élevés sur au moins deux prélèvements distincts (22).

L'**aménorrhée chimio-induite** (ACI) pendant la durée du traitement peut s'expliquer par la **destruction des follicules en croissance**. Si le pool de follicules quiescents reste satisfaisant, la population de follicules en croissance sera reconstituée et l'ACI ne sera que **temporaire**, avec une reprise des cycles à l'arrêt du traitement. A plus long terme, on peut observer chez les femmes ayant reçu une CT, une altération prématurée de la réserve ovarienne avec baisse de la fenêtre de conception, voire une **IOP**, résultant de la **perte des follicules primordiaux** (23).

L'impact de la CT sur la folliculogénèse dépend en partie du **mode d'action** des molécules administrées. Ainsi, une CT agissant uniquement sur les cellules en division aura

une toxicité sur la cohorte de follicules en croissance alors qu'une CT qui agit sur les cellules quiescentes aura une toxicité sur le stock de follicules primordiaux (23).

L'AMH est produite par les CG des follicules pré-antraux et des petits follicules antraux de moins de 8 mm de diamètre (14). Le taux d'**AMH à J3 du cycle** est très fortement corrélé avec le CFA et avec le pool de follicules primordiaux, et elle constitue un **marqueur de la réserve ovarienne**. L'AMH est un **marqueur en temps réel** de la **déplétion** folliculaire sous CT mais aussi de la **récupération** ovarienne après la fin du traitement (12).

b. Mécanismes de l'ovariotoxicité liée à la chimiothérapie

Plusieurs hypothèses sont évoquées pour expliquer la déplétion folliculaire liée aux traitements anti-cancéreux gonadotoxiques (23).

i. **Toxicité directe par apoptose des ovocytes et/ou des cellules de la granulosa**

Premièrement, les agents de CT exercent un effet direct de destruction des follicules primordiaux et/ou des follicules en croissance. Cet effet toxique serait dû à une action pro-apoptotique de la drogue, soit directe sur l'ovocyte, soit indirecte via un effet toxique sur les cellules somatiques adjacentes, et qui aboutirait à une mort ovocytaire. Comme nous l'avons vu, il existe une communication bidirectionnelle entre l'ovocyte et les CG qui l'entourent afin que chacune régule la maturation et la croissance de l'autre (23).

ii. **Toxicité indirecte par recrutement excessif des follicules primordiaux : « burn-out » folliculaire**

Deuxièmement, la chute de l'AMH liée à la destruction des follicules en croissance par la CT entraîne une levée du frein inhibiteur sur le recrutement folliculaire initial et conduit à un recrutement excessif des follicules primordiaux vers le pool de follicules en

croissance (12). Cet épuisement du stock de follicules primordiaux est appelé « burn-out folliculaire » (23).

### **iii. Toxicité par altération du stroma ovarien**

Troisièmement, la toxicité des protocoles de CT sur la fonction ovarienne peut s'expliquer aussi par un processus de fibrose ovarienne corticale et des altérations vasculaires du tissu stromal ovarien (12). Des modifications histologiques ont été observées dans les ovaires de patientes exposées à une CT (23):

- une modification de la structure des gros vaisseaux corticaux avec un épaississement et une hyalinisation du vaisseau, une fibrose de l'intima et un épaississement de la couche musculaire, résultant en un rétrécissement voire une oblitération de la lumière vasculaire ;
- l'apparition d'une néovascularisation anarchique dans le cortex ovarien ;
- de multiples zones de fibrose corticale sous-capsulaire avec préservation de l'épithélium de surface ovarien.

La mauvaise vascularisation du cortex ovarien induit une ischémie locale et donc l'apparition de zones de fibrose, ce qui a pour conséquence une perte focale des follicules primordiaux. Cette ischémie locale est d'autant plus importante que le protocole de CT est toxique sur le plan vasculaire (23).

### **iv. Impact sur la voie PI3K/Akt/FOXO3a**

Une autre hypothèse expliquant la toxicité liée à la CT serait liée à leur action sur la voie PI3K/Akt/FOXO3a.

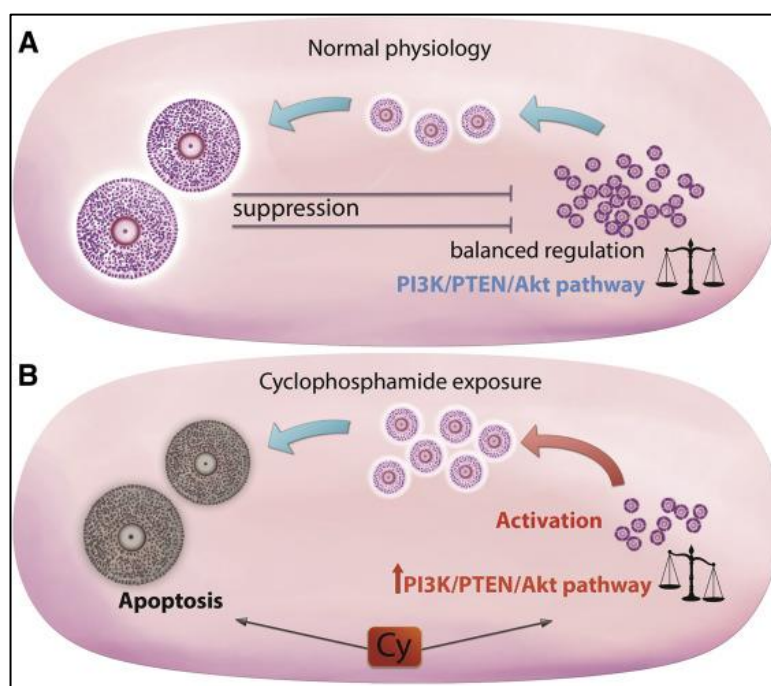
#### **1. Blocage des follicules primordiaux au stade dormant lié à la translocation nucléaire de FOXO3a**

Certaines drogues entraîneraient le blocage des follicules primordiaux à l'état de quiescence par action directe sur la voie PI3K. En effet, dans une lignée cellulaire de cancer

du sein MCF-7 , il a été montré que le paclitaxel, une molécule de la famille des taxanes, entraîne une augmentation dose-dépendante de la localisation nucléaire de FOXO3a, en lien avec une diminution de la signalisation Akt, et une augmentation de l'activité de JNK1 / JNK2 (c-Jun N-terminal kinase 1/2), (24). Cette signalisation conduit à l'apoptose des cellules tumorales. Dans l'ovaire, la localisation nucléaire de FOXO3a, est associée à une inhibition de l'activation des follicules primordiaux (24).

## 2. Hyperactivation des follicules primordiaux conduisant au « burn-out » folliculaire

Des études menées chez la souris ont montré que l'activation de la voie **PTEN/Akt/FOXO3a** est aussi impliquée dans la déplétion des follicules primordiaux induite par la CT (cf Figure n°6).



**Figure n°6 : Le « burn-out » ovarien.** D'après Kalich-Philosoph L *et al.* Science Translational Medicine, 2013. (25)

Le traitement par **cisplatine** diminue l'expression de PTEN, conduisant à une augmentation de la phosphorylation de molécules clés de cette voie. L'activation de la



cascade PI3K/Akt/FOXO3a favorise l'export nucléaire de FOXO3a, qui est suivi par une augmentation de l'activation des follicules primordiaux. La pan-activation des follicules primordiaux dormants conduit à une **augmentation du nombre de follicules en croissance**, qui sont plus sensibles au processus **apoptotique** (26).

De même, le **cyclophosphamide** (Cy) est responsable d'un recrutement excessif des follicules primordiaux. En effet, chez des souris traitées par Cy, l'analyse protéique des ovaires a montré une augmentation de la phosphorylation d'Akt, de mTOR, et de rpS6 associée à l'inactivation de FOXO3a. Une fois la croissance initiée, les grands follicules étaient sujets à l'apoptose induite par le Cy. Ainsi, le recrutement folliculaire résulte en un « burn-out » de la réserve des follicules primordiaux. Pour prévenir les effets secondaires du Cy sur la fertilité, un composé immuno-modulateur, **AS101**, a été testé. AS101 inhibait la transition des follicules primordiaux en follicules primaires et secondaires via la voie PI3K/PTEN/Akt et réduisait l'apoptose des CG dans les follicules en croissance. Il est également intéressant de noter que, *in vitro*, AS101 augmentait la sensibilité des lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 et MDA-MB-231 à la CT (25). Les inhibiteurs de mTORC1 (**everolimus**), et les inhibiteurs de mTORC1/2 représentent d'autres agents pharmacologiques prometteurs dans le but de préserver la fonction ovarienne et la fertilité durant une CT avec Cy (1). La down-régulation pharmacologique de la voie mTOR au cours d'un traitement par Cy chez la souris prévenait l'activation excessive des follicules primordiaux, préservait la fonction ovarienne, et maintenait une fertilité normale.

#### **v. Lésions de l'ADN induites par la chimiothérapie**

En général, les traitements cytotoxiques agissent en causant des lésions de l'ADN, déclenchant une réponse en cascade complexe dans laquelle la cellule tente initialement de réparer les lésions de l'ADN. En cas d'échec, la cellule entre en apoptose. Il est probable

que des **cassures de l'ADN double-brin** non réparées persistantes fassent partie des lésions de l'ADN causées par la CT qui activent l'apoptose dans les ovocytes (27).

c. Prise en charge des patientes à l'Observatoire de la Fertilité du CHU de Lille

Ayant connaissance des effets délétères de la CT sur la fertilité, et de l'impact sur la qualité de vie des patientes, la législation française prévoit que « *toute personne peut bénéficier du recueil et de la conservation de ses gamètes ou tissu germinale (...) lorsqu'une prise en charge médicale est susceptible d'altérer sa fertilité (...)* » (art. L. 2141-11 de la loi de bioéthique n°2004-800 du 6 août 2004).

Au CHU de Lille, les patientes devant recevoir un protocole de CT gonadotoxique sont adressées par leur oncologue à un médecin de la reproduction de l'**Observatoire de la Fertilité** afin d'être informées des effets secondaires du traitement sur leur fonctionnement ovarien et leur fertilité future. Cet observatoire, mis en place au sein du CHU de Lille en 2006 par le Docteur Christine Decanter, médecin de la reproduction et responsable du Centre de Préservation de la Fertilité Jeanne de Flandre, est à la disposition de tous les centres d'Oncologie publics et privés, adultes et enfants, de la région Hauts-de-France. Il permet de **suivre la fonction ovarienne des patientes** avant, pendant, et après CT.

**Avant** la mise en route du **traitement**, un **bilan de la réserve ovarienne** est établi chez la patiente. Il comprend une échographie pelvienne avec estimation du CFA, associé à un bilan biologique [AMH, FSH, LH (luteinizing hormone), E2]. Une **préservation de la fertilité** est proposée à chaque patiente et le choix de la technique dépend de différents paramètres dont l'âge de la patiente, le type de cancer, la nature du protocole de CT et le degré d'urgence de la mise en oeuvre du traitement (28). Il existe actuellement quatre techniques de préservation de la fertilité : la congélation ovocytaire (ovocytes obtenus après COS), la congélation embryonnaire (de moins en moins utilisée pour des raisons éthiques),

la cryopréservation de tissu ovarien et la protection ovarienne médicamenteuse [blocage de la fonction ovarienne par analogues du GnRH (Gonadotrophin-Releasing Hormone)].

**Pendant et après la CT**, les patientes sont suivies à l'Observatoire de la Fertilité à différents temps clés : 15 jours après le premier cycle de CT (AMH1), 15 jours avant la dernière cure de CT (AMH2), tous les 3 mois durant la première année suivant la fin de la CT (AMH+3, AMH+6, AMH+9, AMH+12), puis à 6 mois d'intervalle durant la deuxième année (AMH+18, AMH+24). A chaque visite, les patientes bénéficient d'une évaluation clinique, dont le recueil du **statut menstruel**, et d'une prise de sang pour dosage de l'**AMH sérique** par la technique de routine. Des prélèvements sanguins en vue de constituer une sérothèque et une plasmathèque sont également réalisés et conservés à -80°C au Centre de Conservation des Echantillons (CDCE) du Centre de Biologie Pathologie Génétique (CBPG). Notre étude s'est portée sur l'aspect de la prise en charge de la fertilité des patientes après traitement, et plus particulièrement sur la **recupération de la fonction ovarienne précoce post-CT**.

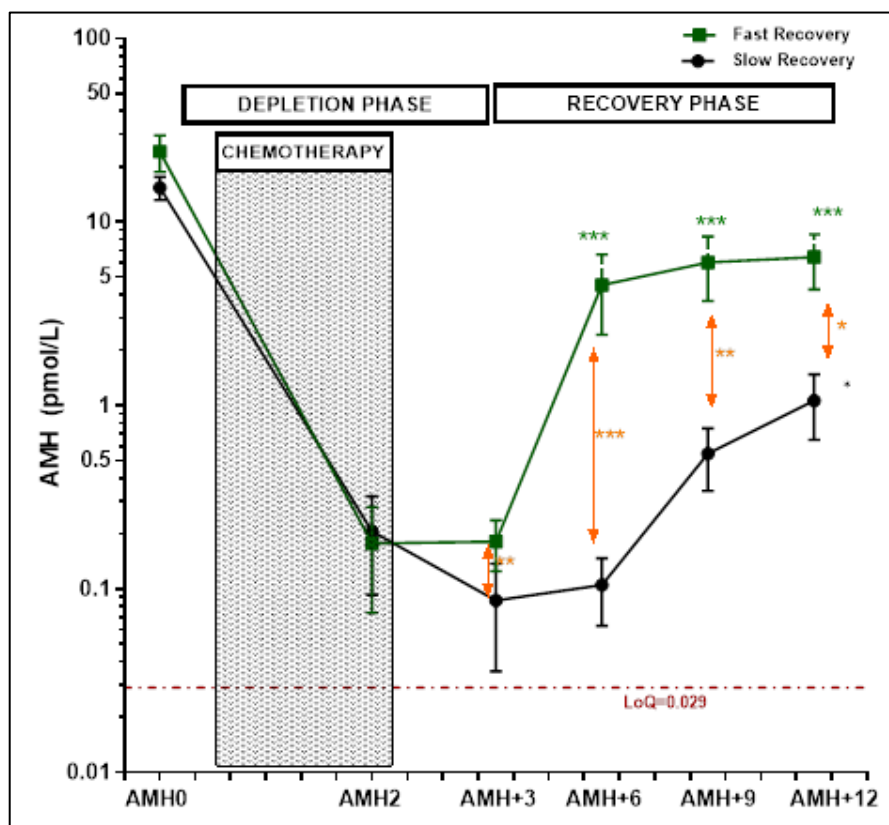


### 3. Objectifs de l'étude

Notre travail fait suite à une étude longitudinale menée à l'Observatoire de la Fertilité (14), chez des patientes âgées de moins de 40 ans et atteintes d'un cancer du sein à un stade précoce. Les patientes avaient toutes été traitées par chirurgie et par le même protocole de CT adjuvante, à savoir trois cycles de FEC100 (5-fluorouracile 500 mg/m<sup>2</sup>, epirubicine 100 mg/m<sup>2</sup>, et Cyclophosphamide 500 mg/m<sup>2</sup>) et trois cycles de taxanes (docetaxel 100 mg/m<sup>2</sup>).

Cliniquement, les patientes pouvaient être classées en deux groupes selon leur **statut menstruel à 6 mois de la fin de la CT**. En effet, certaines patientes présentaient une récupération rapide de leurs cycles menstruels (**Groupe Cyclée**, n = 17) tandis que les autres patientes étaient encore en aménorrhée (**Groupe Aménorrhée**, n = 15) à 6 mois post-CT (14).

Cette étude a permis, grâce à une technique de dosage de l'AMH ultra-sensible (Technique **pico-AMH** AL-124-i par AnshLabs, limite de quantification d'environ **0.03 pmol/l**), de mettre en évidence des **profils d'évolution des concentrations d'AMH différents** entre les deux sous-groupes de patientes (cf Figure n°7), ce que n'avait pas permis la technique conventionnelle [Technique EIA AMH/MIS (A11893) par Beckman Coulter, limite de quantification de 3.0 pmol/L]. Les taux d'AMH étaient significativement différents entre les deux sous-groupes dès le temps AMH+3, avec un profil de récupération rapide et important dans le groupe Cyclée (« **fast recovery** ») versus un profil de récupération lent et partiel dans le groupe Aménorrhée (« **slow recovery** »).



**Figure n°7 : Le profil des concentrations d'AMH après chimiothérapie chez des jeunes patientes atteintes d'un cancer du sein est lié à la récupération de l'activité menstruelle.**

Concentrations d'AMH chez les femmes ayant retrouvé une activité menstruelle à 6 mois (récupération rapide,  $n = 17$ ) ou plus tardivement (récupération lente,  $n = 15$ ). \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  ; \*\*\*  $p < 0.001$  comparé à AMH2 par le test de Friedman (caractères noir et vert). Les valeurs entre les sous-groupes ont été comparées par le test U de Mann-Whitney (caractères orange). Sur l'axe des abscisses chaque barre correspond à 1 mois. D'après Decanter C et al. *Reprod Biomed Online*, 2018 (14).

Les **mécanismes physiopathologiques** expliquant la persistance plus ou moins longue de l'ACI, et les **facteurs prédictifs de sa durée** sont mal connus. Pour tenter d'expliquer cette susceptibilité ovarienne individuelle à la CT, nous avons cherché à identifier des **facteurs** qui pourraient **réguler** la voie de signalisation **PI3K/Akt/mTORC1** impliquée dans l'activation folliculaire. Notre hypothèse de travail était que **l'état nutritionnel ou inflammatoire de la patiente pourrait affecter la durée de l'ACI** en modulant les effets des drogues de CT sur la voie **PI3K/Akt/mTORC1**. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, le **métabolisme** et la prise alimentaire influencent

l'activité du complexe **mTORC1** qui joue un rôle important dans l'activation des follicules primordiaux. Par ailleurs, en s'appuyant sur le lien entre **IL-6** et activation de la **voie PI3K/Akt** dans les cellules endothéliales vasculaires humaines, nous avons supposé que cette voie pouvait être aussi régulée dans l'ovaire par l'IL-6 ainsi que par d'autres cytokines.

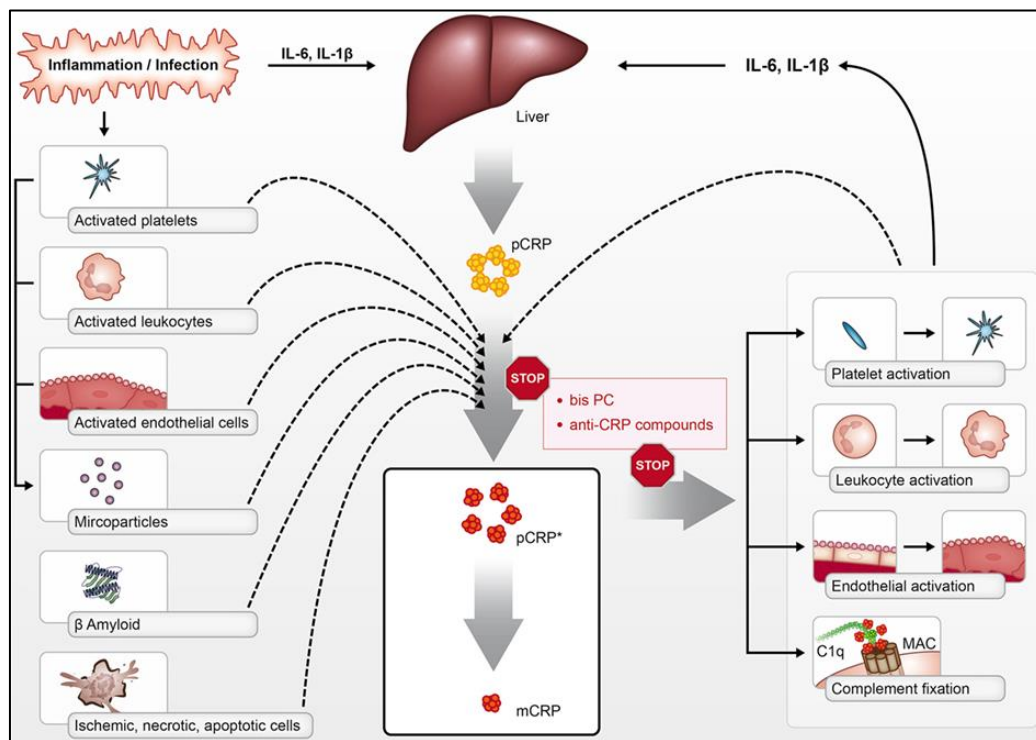
Nous avons dosé dans les échantillons sanguins de ces patientes des **marqueurs biologiques** reflétant d'une part l'**état inflammatoire** et d'autre part l'**état nutritionnel**. Les paramètres de l'inflammation étaient représentés par : la protéine C réactive évaluée par un dosage ultra-sensible (**CRP<sub>us</sub>**), l'alpha-1-antitrypsine ( **$\alpha$ 1-AT**) et un panel de cytokines comprenant l'interleukine-1 bêta (**IL-1 $\beta$** ), l'interleukine-4 (**IL-4**), l'interleukine-6 (**IL-6**), l'interleukine-8 (**IL-8**), l'interleukine-10 (**IL-10**) et le tumor necrosis factor alpha (**TNF- $\alpha$** ). L'état métabolique a été appréhendé par la mesure du **BMI** (Body-Mass Index), ainsi que par le dosage de la **leptine** et de la sex-binding protein (**SBP**).

## 4. Marqueurs étudiés

### a. Marqueurs reflétant l'état inflammatoire

#### i. CRP

La CRP est une protéine pentamérique de la superfamille des pentraxines, synthétisée par les **hépatocytes** en réponse à l'**inflammation** sous l'influence de cytokines pro-inflammatoires (**IL-6**, **IL-1** et **TNF- $\alpha$** ), (29). Il a été suggéré que la CRP agit comme un médiateur direct de la réaction inflammatoire et de la réponse immunitaire innée (cf Figure n°8), (30).



**Figure n°8 : Production de la CRP et champ d'action.**

La CRP pentamérique (pCRP) peut être dissociée à la surface cellulaire en ses isoformes pro-inflammatoires : une forme intermédiaire (pCRP\*), et ultimement la CRP monomérique (mCRP). Ces deux isoformes peuvent activer les plaquettes, les leucocytes, les cellules endothéliales et le complément. Les effets pro-inflammatoires de pCRP\* et mCRP peuvent être inhibés par le bis-PC (1,6-bis-phosphocholine-hexane). D'après Mc Fadyen JD et al. *Frontiers in Immunology*, 2018. (30)



Cette **protéine de la phase aiguë** présente plusieurs caractéristiques qui en font un **marqueur de diagnostic** et de **suivi** intéressant :

- Sa cinétique rapide (augmentation dans les 6 à 8 premières heures suivant l'inflammation), c'est donc un **marqueur précoce** de l'inflammation (29).
- Les concentrations de CRP atteignent un **pic à environ 48 h** (24 à 72h), (29).
- Sa **demi-vie courte** (environ 12 heures) explique le déclin rapide des taux de CRP après résolution de la cause de l'inflammation (31).
- Sa forte **amplitude de variation**.
- Sa **bonne stabilité *in vitro*** à température ambiante et les bonnes **performances analytiques** des méthodes de dosage (32).

La CRP est normalement présente en faible concentration dans le sérum (de l'ordre du milligramme par litre). De nombreux facteurs influencent les taux de base de CRP, incluant l'âge, le sexe, le statut tabagique, le poids, le taux de lipides, et la pression artérielle (31). La CRP augmente en cas d'infections, de lésions tissulaires ou d'autres processus inflammatoires. Des valeurs de **CRP supérieures à 6 mg/l** révèlent ainsi une **inflammation patente** (données du laboratoire, B. Onraed, pers. comm.). Ce marqueur n'est pas spécifique de la cause de l'inflammation, cependant, le niveau d'élévation de la CRP peut guider le clinicien sur l'origine bactérienne ou virale d'une infection, l'augmentation de la CRP étant plus forte en cas d'infection bactérienne (29).

Le développement d'une technique de dosage plus sensible, appelée **CRP ultrasensible** (CRP<sub>us</sub>), a permis de mettre en évidence chez certains sujets un **état inflammatoire de bas grade** (low-grade inflammation : **LGI**), (33). La LGI peut être définie par des concentrations plasmatiques de **CRP comprises entre 3 et 6 mg/l**. Cet état est associé à un risque accru de développer de nombreuses maladies (coronaropathies, arthrite rhumatoïde et cancer). La CRP<sub>us</sub> est utilisée comme marqueur de stratification du

risque cardio-vasculaire [recommandations du groupe d'experts AHA (American Heart Association) / CDC (Centers for Disease Control and Prevention), (34)].

Nous avons donc choisi dans notre étude de doser la **CRP** du fait des concentrations faibles attendues chez nos patientes.

## ii. **Alpha-1 antitrypsine**

L' $\alpha$ 1-AT est une glycoprotéine de taille relativement faible (52 kDa) synthétisée essentiellement par le **foie** (synthèse inductible par les œstrogènes). Sa durée de demi-vie est de 4 à 5 jours (35). L' $\alpha$ 1-AT appartient à la superfamille des serpins, inhibiteurs de protéases à sérine, jouant un rôle majeur dans la régulation des processus physiologiques comme **l'inflammation** et la coagulation. Elle représente le principal **inhibiteur de protéases** du plasma humain, protégeant ainsi le parenchyme pulmonaire contre les agressions protéolytiques. Elle est également impliquée dans la régulation de la réponse inflammatoire. En effet, l' $\alpha$ 1-AT est une **protéine positive de la phase aiguë** de la réaction inflammatoire. Elle exerce son activité anti-inflammatoire par son activité inhibitrice de l'élastase [libérée par dégranulation des polynucléaires neutrophiles (PNN) activés] et de la protéinase 3 leucocytaires ainsi que par une activité de **régulation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires**, en particulier l'IL-6, l'IL-8, le TNF- $\alpha$  (35) et l'IL1- $\beta$  (36) avec une amélioration de la libération d'IL-10 (36). Enfin, elle interviendrait dans d'autres processus : contrôle de l'apoptose, inhibition de l'angiogenèse et de la croissance tumorale (35).

Les concentrations d' $\alpha$ 1-AT augmentent **48 à 72 h** après le début de l'inflammation. Etant donné la cinétique différente de l' $\alpha$ 1-AT et de la CRP, nous avons voulu évaluer l'évolution des concentrations d' $\alpha$ 1-AT en tant que paramètre reflétant une inflammation

**chronique** tandis que la CRPus était plutôt représentative d'une inflammation **aiguë**, du fait de sa cinétique rapide.

b. Marqueurs influençant l'état inflammatoire

i. **Généralités sur les cytokines**

Les cytokines sont des **messagers chimiques** de la communication intercellulaire impliqués dans de multiples fonctions de l'organisme, en particulier dans le développement de la **réponse immune** normale ou pathologique, dans la physiopathologie de l'**inflammation** et dans l'**hématopoïèse** (37). Les cytokines sont des protéines glycosylées composées d'une centaine d'acides aminés, produites par une grande variété de cellules et agissant sur de nombreuses cellules cibles (**actions pléiotropiques**). Leurs actions s'effectuent selon différents modes : sur les cellules voisines (mode **paracrine**), sur les cellules productrices (mode **autocrine**) ou à distance (mode **endocrine**). Elles agissent sur les cellules cibles en se liant avec une forte affinité à des récepteurs spécifiques, entraînant une cascade d'évènements intra-cellulaires aboutissant à la régulation de la transcription de gènes. Les cytokines peuvent être classées de différentes manières, notamment sur la base du **type de récepteur** auxquelles elles se lient (**classification** adaptée de **Vilcek**) : les récepteurs de cytokines de type I (famille hématopoïétine) et de type II [famille interféron (IFN)], les récepteurs de la famille du TNF, le récepteur de l'IL-1 et les récepteurs Toll-like (TLRs) apparentés, les récepteurs de l'IL-17, les récepteurs tyrosine kinases et les récepteurs sérine kinases de la famille du TGF- $\beta$  (38). Notre étude s'est plus particulièrement intéressée à quatre cytokines présentant une activité pro-inflammatoire : l'**IL-1 $\beta$** , l'**IL-6**, l'**IL-8** et le **TNF- $\alpha$** , et à deux cytokines immuno-modulatrices aux propriétés « anti-inflammatoires » : l'**IL-4** et l'**IL-10**.

## ii. Cytokines à activité pro-inflammatoire

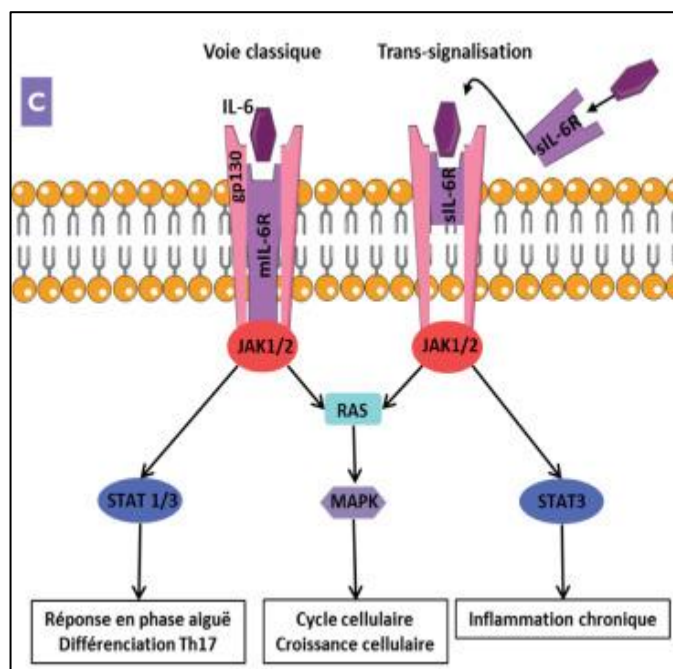
### 1. L'interleukine-6

L'IL-6 est produite par de nombreuses cellules dont les macrophages, les cellules endothéliales et les lymphocytes T (39). L'IL-6 possède un **large spectre d'activités** (37). Elle est importante dans la défense de l'hôte, en effet les souris IL-6 déficientes sont sensibles aux infections à *Candida* et *Listeria* (38). L'IL-6 est un facteur de croissance et de différenciation des cellules B en plasmocytes producteurs d'Immunoglobulines (Ig), incluant les IgE (38). De plus, elle favorise la croissance et la différenciation des cellules T. Elle est importante pour la différenciation des lymphocytes T-helper 17 (Th17, rôle pro-inflammatoire) aux dépens des lymphocytes T régulateurs (40), et pour la réponse cellulaire T-cytotoxique aux virus (38). En immunité innée, elle module l'hématopoïèse, l'accumulation de PNN sur le site infectieux à travers le contrôle de la granulopoïèse (41).

En tant que cytokine pro-inflammatoire, elle agit au niveau hépatique en induisant la **synthèse de protéines de la phase aiguë** dont la **CRP**. Elle diminue la synthèse d'albumine et de transferrine dans le foie (38). Avec l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  elle exerce un effet pyrogène au niveau cérébral (37). L'IL-6 induit également la synthèse d'hormones adrénocorticotropes et d'hormones anté-hypophysaires comme la prolactine, l'hormone de croissance, et la LH. Elle joue aussi un rôle dans l'ostéoporose (38).

Ses effets biologiques s'exercent via le récepteur de l'IL-6 (**IL-6R**), un récepteur appartenant à la famille des **récepteurs de cytokines de type I**, dont la signalisation intracellulaire fait intervenir la voie JAK-STAT (cf Figure n°9). L'IL-6R est un récepteur dimérique composé de deux sous-unités, la gp80 et la gp130. La transduction du signal s'effectue via la **gp130**. L'IL-6R affiche **deux modes** distincts de **signalisation**, la voie classique et la trans-signalisation. La **voie classique** désigne la liaison de l'IL-6 à l'**IL6-R**

lié à la membrane, et cette voie est restreinte aux cellules exprimant l'IL6-R lié à la membrane. Certaines cellules produisent le récepteur soluble de l'IL-6 (**IL6-sR**), qui après liaison à son ligand induit la signalisation intra-cellulaire sur les cellules ne possédant pas l'IL6-R lié à la membrane (17), (41), et cette voie est connue sous le nom de **trans-signalisation**. La trans-signalisation est associée aux **fonctions pro-inflammatoires** de l'IL-6 tandis que la signalisation classique est liée aux fonctions régénératives et anti-inflammatoires de l'IL-6. Dans les cellules endothéliales vasculaires humaines, la trans-signalisation de l'IL-6 utilise la voie **JAK-STAT3** mais également la voie **PI3K-Akt** (17).

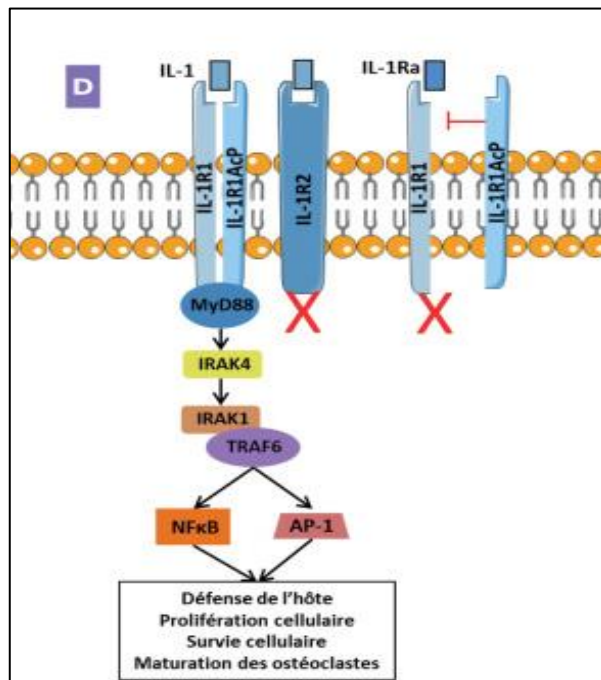


**Figure n°9 : Les voies de signalisation de l'IL-6.** D'après Noack M *et al.* Revue Francophone des Laboratoires, 2018. (41)

## 2. L'interleukine 1 $\beta$

De nombreuses sources sont à l'origine de la production d'IL-1 $\beta$  : macrophages principalement, mais aussi cellules dendritiques, fibroblastes, cellules endothéliales, kératinocytes, et hépatocytes (39). Cette cytokine est synthétisée sous la forme d'un précurseur, le pro-IL-1 $\beta$  (41), qui nécessite d'être clivé pour devenir biologiquement actif. Le clivage a lieu au sein d'un complexe multiprotéique appelé l'inflammasome, dont les composants clés sont la caspase-1 et des récepteurs de type NOD (Nucleotide Oligomerization Domain receptors ; NLR), (38). L'IL-1 module la différenciation et la fonction des cellules lymphoïdes du système inné et du système adaptatif. L'IL-1 $\beta$  a une **activité pro-inflammatoire** au niveau tissulaire, conduisant à la vasodilatation et à l'activation des cellules immunitaires innées telles que les PNN (41). L'IL-1 induit la production d'**IL-6** et de **chémokines** (38). Cette cytokine partage des activités pro-inflammatoires avec l'IL-6 comme l'induction de la fièvre, la synthèse de **protéines hépatiques de la phase aiguë** et la stimulation de la différenciation de lymphocytes T en lymphocytes Th17. Elle joue un rôle dans le développement de la **cachexie**. Elle active les cellules endothéliales entraînant **inflammation** et coagulation (38). L'IL-1 est un facteur pathogénique majeur dans l'auto-inflammation (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, inflammation articulaire, maladies cardiaques), l'auto-immunité ou les infections. Cette cytokine favorise également l'angiogenèse tumorale et les métastases (41).

L'IL-1 $\beta$  agit sur un **récepteur dimérique** composé du récepteur de type I de l'IL-1 (**IL1-RI**) couplé à sa protéine accessoire (**IL1-RI AcP**), cette dernière permettant la transduction du signal (cf Figure n°10), (38), (41).



**Figure n°10 : La voie de signalisation de l'IL-1 et ses récepteurs.** D'après Noack M *et al.* Revue Francophone des Laboratoires, 2018. (41)

### 3. Le TNF- $\alpha$

Le TNF- $\alpha$  est une **cytokine pléiotropique** exerçant des fonctions homéostatiques mais également impliquée dans la pathogenèse de diverses maladies (41). Il est produit par les macrophages, les lymphocytes T et les cellules NK (Natural Killer), (39). Cette glycoprotéine est exprimée sous deux formes, une protéine membranaire et une protéine soluble résultant du clivage de la forme membranaire par une métalloprotéase TACE (TNF- $\alpha$ -converting enzyme), (42).

Le TNF- $\alpha$  joue un rôle important dans le développement de l'**inflammation**. En effet, il est induit à la suite de lésions cellulaires ou bactériennes [par le lipopolysaccharide (LPS)], et exerce d'une part une action apoptotique directe sur les cellules infectées et d'autre part une action indirecte en stimulant l'activité cytotoxique des macrophages. Le TNF- $\alpha$  active la transcription de différentes cytokines pro-inflammatoires [**IL-1**, **IL-6**, interleukine-18 (**IL-18**)] et de facteurs de croissance hématopoïétiques afin

d'amplifier la réponse inflammatoire conduisant à la synthèse des **protéines de l'inflammation** d'origine hépatique (**CRP**), notamment *via* l'IL-6 et la prostaglandine E2 (42). Il induit la fièvre, l'hypoglycémie, la cachexie, et diminue la contractilité myocardique. C'est le médiateur majeur du choc septique (38).

Cette cytokine génère également la synthèse de métalloprotéinases matricielles (MMP) de type collagénase, gélatinase, et stromélysine 1, qui sont impliquées dans la destruction de la matrice extra-cellulaire (MEC) et la migration cellulaire. La migration des PNN est améliorée à l'aide d'un gradient chimiotactique de TNF- $\alpha$  (42). Lors de l'**ovulation**, le TNF- $\alpha$  est libéré au cours de la dégradation de la MEC par les enzymes protéolytiques (plasmine, MMP) sécrétées par les cellules folliculaires sous l'influence de la LH. Il favorise l'**apoptose des cellules épithéliales** superficielles apicales dans le **follicule pré-ovulatoire** (4).

Au niveau de l'endothélium, le TNF- $\alpha$  augmente la perméabilité vasculaire, induit l'activité pro coagulante ainsi que l'expression de molécules d'adhésions et de chimiokines (MCP-1, **IL-8**). Ces molécules favorisent le recrutement et l'activation des cellules immunitaires au niveau du site inflammatoire. Le TNF- $\alpha$  stimule également l'expression de **facteurs angiogéniques** [Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)] et facilite la néoangiogenèse (42).

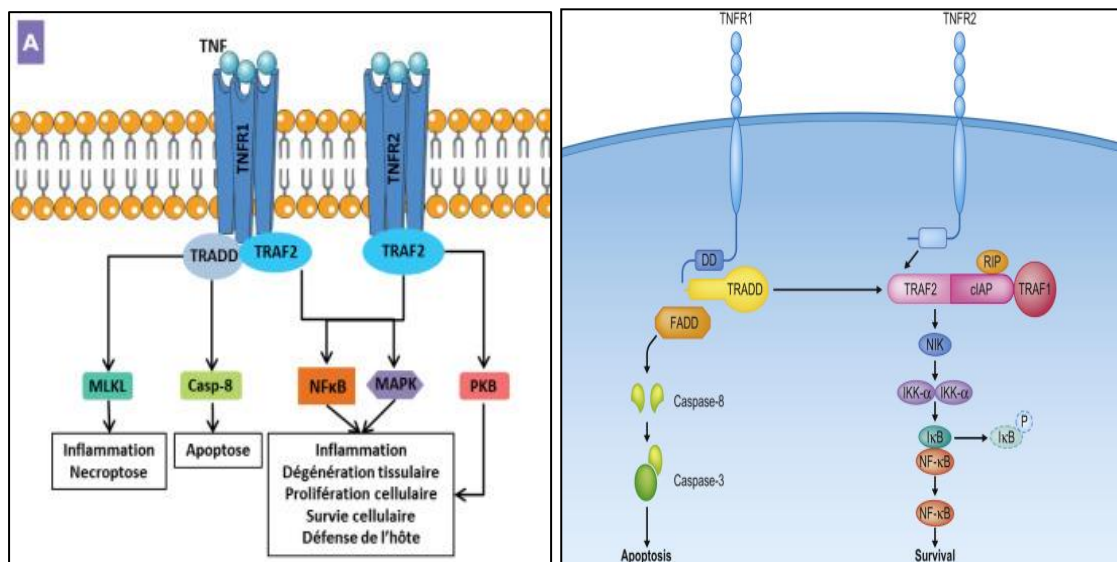
La réaction inflammatoire est suivie d'une réponse anti-inflammatoire, initiée également par le TNF- $\alpha$  en coopération avec l'IL-1, et induite par les récepteurs solubles du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1. L'IL-10, induite par le TNF- $\alpha$ , joue un rôle important dans cette réponse par sa capacité à inhiber la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 et d'IL-6 par les macrophages et les PNN. Cette étape est suivie par une phase de réparation tissulaire et de cicatrisation (42).



Il existe deux types de récepteurs trimériques au TNF- $\alpha$  (cf Figure n°11) :

- Le récepteur de type I (**TNFR1**) est exprimé de manière ubiquitaire. Il semble initier la plupart des fonctions biologiques du TNF- $\alpha$ , notamment son **activité inflammatoire et cytotoxique** via son domaine de mort cellulaire capable d'induire un signal apoptotique, et dont le TNFR2 est dépourvu (42).
- Le récepteur de type II (**TNFR2**), dont l'expression est restreinte à certains types cellulaires, interviendrait plutôt dans la **régulation de la prolifération et la survie**, notamment au niveau des cellules du système immunitaire (42).

Les protéines adaptatrices [TNF receptor-associated death domain (TRADD), TNF receptor-associated factor (TRAF)] recrutées au niveau du domaine cytoplasmique de ces récepteurs activent des voies de signalisation impliquées dans **l'initiation de l'apoptose cellulaire** (caspases 8 et 3) ou dans la **réponse inflammatoire** [nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B), mitogen-activated protein kinases (MAPK)], (38).

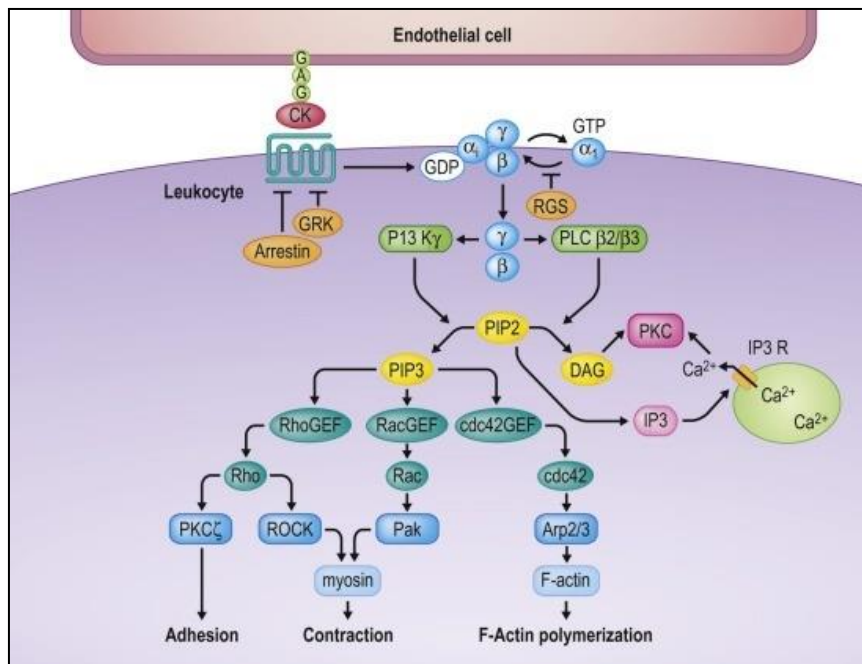


**Figure n°11 : Voies de signalisation induites par le TNFR1 et le TNFR2.** D'après O'Shea JJ. Clinical Immunology, 2019 (38) ; Noack M *et al.* Revue Francophone des Laboratoires, 2018. (41)

#### 4. L'Interleukine-8

L'IL-8 (**CXCL8**) appartient à une famille de petites cytokines, les **chimiokines**, ayant la propriété d'attirer et de favoriser le déplacement de diverses cellules vers leur site de production (chimiotactisme), (37). Au sein de cette famille, elle fait partie du groupe CXC (un acide aminé est intercalé entre les deux premiers résidus cystéines). L'IL-8 est produite par les macrophages/monocytes, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. Elle agit en particulier sur les **PNN** par ses propriétés de **chimiotactisme vers le site inflammatoire** ainsi qu'en stimulant leur fonction de phagocytose et leur dégranulation (43). Elle est également chimiotactique pour les polynucléaires basophiles et les lymphocytes T (43).

Le système des chimiokines peut être classé immunologiquement en deux sous-groupes : inflammatoire et homéostatique, selon le profil d'expression des récepteurs (44). La plupart de ces récepteurs reconnaissent plusieurs chimiokines, ce qui confère une certaine robustesse au système puisqu'une même fonction peut être remplie par plusieurs molécules (45). Les récepteurs **CXCR1** et **CXCR2** sont plus spécifiques de l'IL-8 (46). Les chimiokines activent des **récepteurs couplés à des protéines G**, principalement des protéines G hétérotrimériques de type Gi, (cf Figure n°12). Divers effecteurs dépendants de la protéine G sont ensuite recrutés, incluant la **PI3K $\gamma$** . La voie PI3K $\gamma$  est particulièrement importante pour la **migration cellulaire**. Pour cela, la PI3K recrute quatre différentes protéines : **Akt**, Rac, Rho et Cdc42, qui modulent des phases distinctes du mouvement cellulaire dans divers systèmes modèles. **Cdc42** active notamment la **polymérisation de l'actine-G** en actine-F (44).



**Figure n°12 : Transduction du signal des chémokines lors du chimiotactisme.** D'après Murphy PM. Clinical Immunology.,2019 (44).

### iii. Cytokines immuno-régulatrices aux propriétés « anti-inflammatoires »

#### 1. Interleukine-4

L'IL-4 est produite par les lymphocytes T CD4+ de type Th2, les mastocytes et les basophiles (37), (39). L'IL-4 favorise les réponses allergiques et inhibe les réponses immunitaires cellulaires. L'IL 4 induit la commutation isotypique des lymphocytes B vers la production d'IgE. De plus, l'IL4, par ses effets sur les macrophages peut être considérée comme une **cytokine anti-inflammatoire**. En effet, elle **inhibe la synthèse** par les macrophages de cytokines pro-inflammatoires comme l'**IL-1**, le **TNF-α** et l'**IL-6** ainsi que plusieurs chimiokines. Elle stimule également la synthèse des inhibiteurs physiologiques des cytokines pro-inflammatoires [antagoniste compétitif du récepteur à l'IL1 (IL-1Ra), inhibiteurs du TNF]. Enfin, l'IL4 inhibe la production d'IFN-γ par les lymphocytes NK stimulés (inhibition de la réponse de type Th1), et c'est un facteur de prolifération et de différenciation des lymphocytes T CD4 + en lymphocytes Th2.

L'IL-4 se lie à un récepteur appartenant à la famille des **récepteurs de cytokines de type I**, famille à laquelle appartiennent également les récepteurs de l'IL-6 et de la leptine. L'IL-4 se lie à deux complexes de récepteurs différents. La signalisation intra-cellulaire du récepteur de l'IL-4 s'effectue via la voie **JAK-STAT** (38).

## 2. Interleukine 10

Elle est produite par les macrophages, les lymphocytes T (principalement les T régulateurs), les cellules B, les kératinocytes, les cellules épithéliales bronchiques et d'autres cellules (38). Le LPS et le TNF sont des inducteurs de l'IL-10.

La fonction principale de l'IL-10 est de jouer le rôle de **cytokine anti-inflammatoire et immunosuppressive** (38). Elle inhibe l'expression de l'interleukine-12 (IL-12), des co stimulateurs et du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de type II par les macrophages, ainsi que la fonction présentatrice d'antigènes des macrophages et l'activation des lymphocytes T CD4+. L'IL-10 **diminue** la production de **cytokines pro-inflammatoires** (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) et de **cytokines chimiotactiques**, et stimule la production d'inhibiteurs de l'IL-1 et du TNF- $\alpha$  (37), (39).

Le récepteur de l'IL-10 appartient à la superfamille des **récepteurs de cytokines de type II**, qui activent la voie de signalisation **JAK-STAT** (38).

c. Marqueurs reflétant le statut métabolique

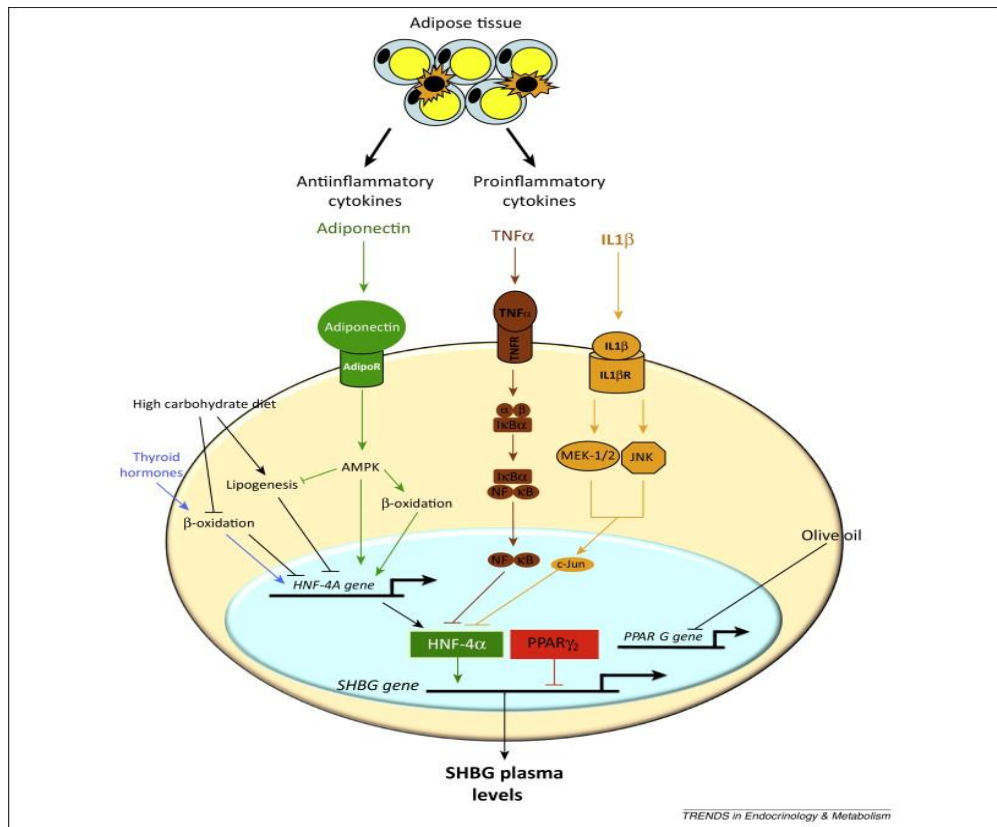
i. **Sex-binding protein**

La SBP est une glycoprotéine homodimérique d'environ 90 kDa produite par le **foie** (47). Dans la circulation sanguine, elle se lie spécifiquement aux **stéroïdes sexuels**, essentiellement la testostérone, la dihydrotestostérone, l'androstènediol et l'E2 avec une forte affinité (supérieure à celle de l'albumine) par le biais d'un seul site de liaison, et régule leur biodisponibilité (48), (49).

Les concentrations sanguines de SBP varient en fonction de l'âge et du sexe (47). Les **œstrogènes** (grossesse, contraceptifs œstro-progestatifs) stimulent la production hépatique de SBP (47), à l'inverse des **androgènes** qui diminuent sa synthèse (49). L'**insuline** régule négativement la production de SBP par les hépatocytes (50), (51). La résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie et l'hyperandrogénie sont caractéristiques des femmes atteintes d'un syndrome des ovaires polykystiques (PCOS). Dans ce syndrome, la concentration sérique de SBP est diminuée (52).

Les taux plasmatiques de **SBP** sont **corrélés négativement avec le BMI**, quel que soit l'âge et le sexe : ils sont bas chez les sujets obèses et élevés en cas d'anorexie mentale (et ils se corrigent après perte/gain de poids). Ainsi, le dosage plasmatique de SBP pourrait constituer un **indicateur fiable du statut nutritionnel** dans ces troubles alimentaires (53). Il a été démontré que la teneur en graisse hépatique plutôt que la masse grasse corporelle totale ou la graisse viscérale, était le déterminant majeur des taux de SBP circulante (53). Des concentrations sériques faibles de SBP chez les individus en surpoids représentent un biomarqueur du syndrome métabolique et sont prédictives du risque de diabète de type 2 (54) et de maladies cardio-vasculaires (MCV) (53).

Des études épidémiologiques ont montré que les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de bas grade (obésité, diabète, arthrite rhumatoïde), dans lesquelles les niveaux de cytokines pro-inflammatoires circulantes sont augmentés, présentent de faibles taux plasmatiques de SBP. La SBP est **régulée négativement** par la cytokine pro-inflammatoire **TNF $\alpha$**  *via* le facteur de transcription **NF- $\kappa$ B**. L'**IL-1 $\beta$**  serait également capable de diminuer les concentration sériques de SBP en activant le facteur de transcription nucléaire **c-Jun** aboutissant à la régulation négative du gène *HNF-4 $\alpha$*  (cf Figure n°13), (53).



**Figure n° 13 : Mécanismes moléculaires régulant la production hépatique de SBP.**  
D'après Simó R *et al.* Trends in Endocrinology & Metabolism, 2015. (53)

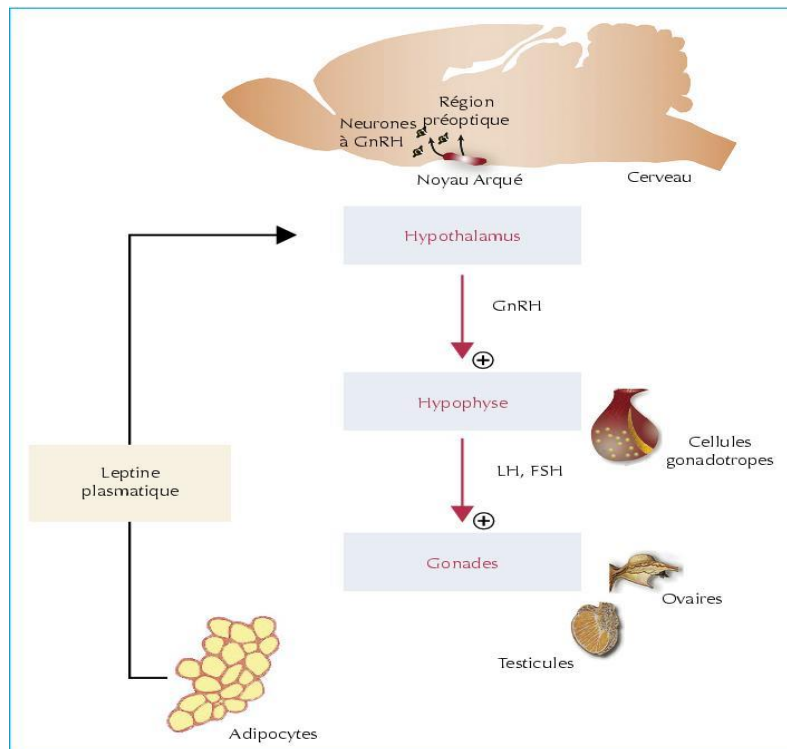
## ii. Leptine

La leptine est codée par le gène *ob* exprimé principalement dans le **tissu adipeux**. (55). Les concentrations de leptine dans le tissu adipeux et le plasma dépendent de la quantité d'énergie stockée sous forme de graisse de même que du statut de la balance énergétique. En effet, les taux de leptine sont **plus élevés** chez les individus **obèses** et augmentent lors d'une suralimentation. Inversement, les individus **maigres** présentent des taux de leptine **plus faibles** et le jeûne entraîne une réduction des taux de leptine circulante. La régulation nutritionnelle de la leptine est médiée au moins en partie par l'**insuline**, ainsi que par d'autres facteurs parmi lesquels on peut citer les **cytokines pro-inflammatoires**, l'infection aiguë, les oestrogènes (effet stimulant) et le tabagisme, les androgènes (effet inhibiteur). La synthèse de leptine est plus importante dans le tissu adipeux sous-cutané que dans le tissu adipeux viscéral. Ainsi, les taux de leptine sont plus élevés chez les femmes que chez les hommes (55).

La leptine est une hormone régulatrice avec de multiples rôles dans le système immunitaire. Elle est produite comme une **cytokine inflammatoire** et les cellules périphériques autres que les adipocytes peuvent produire de la leptine en tant que **réponse inflammatoire** après une **infection**. La production de leptine pourrait agir d'une part comme un activateur de l'inflammation, recrutant des cellules et boostant les fonctions effectrices pour combattre l'infection, et d'autre part comme un signal autocrine et/ou paracrine pour prolonger les effets associés à la leptine, car les cellules immunitaires expriment le récepteur à la leptine (LepR) à leur surface (56).

La leptine peut être considérée comme une hormone anti-obésité dont le rôle primaire est de **diminuer l'appétit** et d'**augmenter les dépenses d'énergie** via son action sur le **cerveau** (57),(55). Le système reproducteur des mammifères est extrêmement sensible à la disponibilité des ressources énergétiques dans l'environnement. Des

modifications du statut énergétique, comme la restriction alimentaire ou l'obésité, peuvent induire des remaniements de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG) et conduire, par exemple, à l'arrêt de la sécrétion de la LH ou altérer la mise en place de la puberté. En effet, la leptine, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations, peut agir directement au niveau de l'**hypothalamus**, plus spécifiquement sur les **neurones du noyau arqué**, pour stimuler la sécrétion de **GnRH** (entraînant une augmentation des taux de FSH et de LH sécrétés par l'anté-hypophyse et contrôlant l'ovulation), (cf Figure n°14), (57). La leptine pourrait être l'un des facteurs capable de réaliser le lien entre l'**équilibre énergétique** et la **reproduction** (57).



**Figure n°14 : Régulation par la leptine de l'axe HHG lorsque les conditions métaboliques et nutritionnelles sont adéquates.** D'après Bouret SG *et al.* Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie, 2008. (57)

Chez la souris, il a été montré que la leptine agit au niveau hypothalamique en recrutant la voie de signalisation de la **PI3K** (58). La **leptine** pourrait également stimuler dans l'ovaire l'expression d'un **facteur angiogénique**, le **VEGF** (59).



# Matériel et méthode

## 1. Etude clinico-biologique

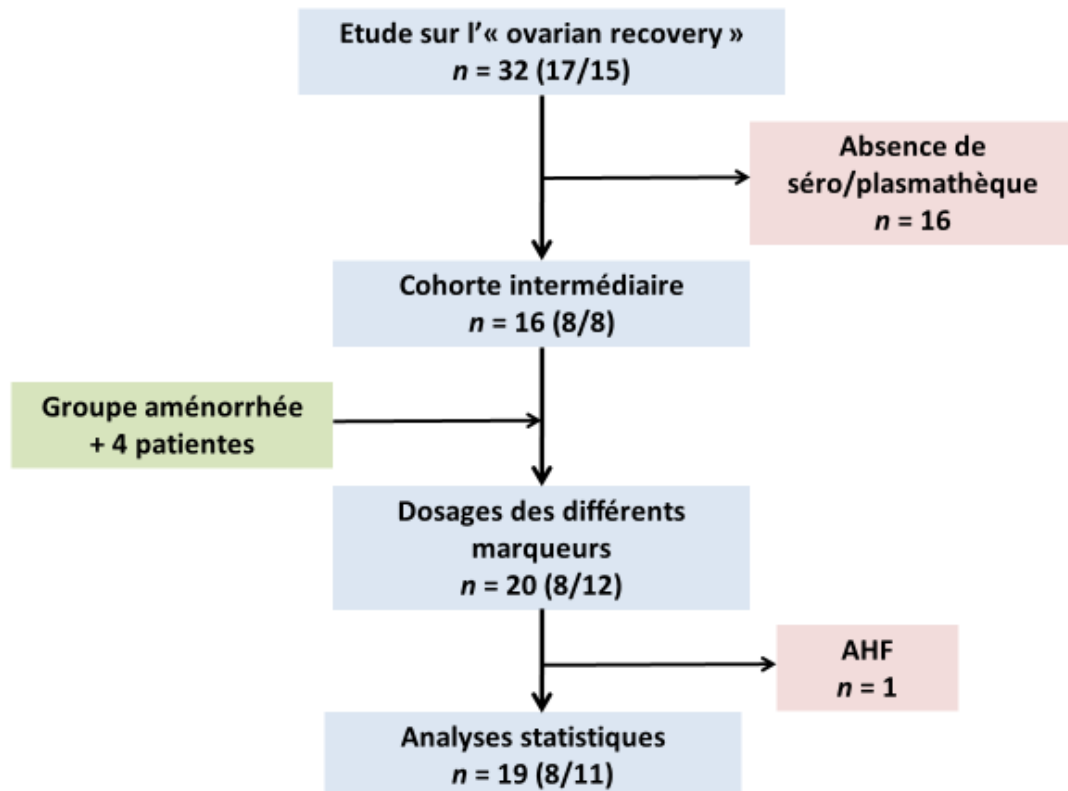
### a. Nombre de prélèvements par patiente

Nous souhaitons étudier chez nos patientes l'évolution des différents marqueurs biologiques dans l'année suivant la fin de la CT, ce qui correspondait à 5 temps : **AMH2** soit 15 jours avant le dernier cycle de chimiothérapie, **AMH+3**, **AMH+6**, **AMH+9** et **AMH+12** c'est-à-dire à + 3, + 6, + 9 et + 12 mois respectivement de la fin de la CT. Pour chaque temps, le dosage des différents paramètres étudiés nécessitait l'utilisation d'un **échantillon de sérum** et d'un **échantillon de plasma EDTA** ce qui représentait au total **10 prélèvements par patiente**.

### b. Effectif de la cohorte

La constitution de notre cohorte de jeunes patientes atteintes d'un cancer du sein pour l'étude de marqueurs nutritionnels et inflammatoires au cours de la récupération ovarienne précoce s'est faite en deux temps.

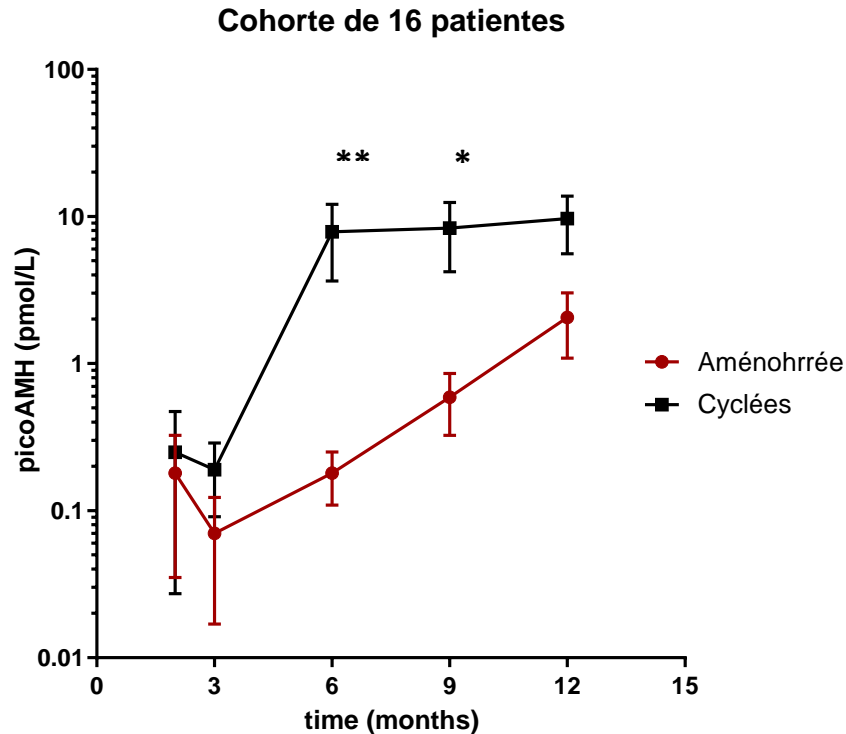
Dans un premier temps, nous avons voulu inclure toutes les **patientes de l'étude préliminaire (n = 32)** présentée dans la partie « Objectifs » de ce travail. Cependant, nous n'avons pas réussi du fait de l'absence de sérothèque et/ou plasmathèque disponibles pour certaines d'entre elles. Nous avons donc choisi d'inclure les patientes pour lesquelles nous disposions de 5 temps, ou à défaut de 4 temps. Cela correspondait à un total de **16 patientes**, à savoir **8 patientes** dans le groupe Cyclée et **8 patientes** dans le groupe Aménorrhée (cf Figure n°15).



*Figure n°15 : Flowchart de notre étude. Présentation des effectifs dans les cases bleues selon la formule  $n = \text{effectif global (Cyclée / Aménorrhée)}$ . AHF = Aménorrhée hypothalamique fonctionnelle.*

Afin de d'assurer que parmi notre cohorte de **16 patientes**, le profil évolutif de la pico-AMH était représentatif de celui de la cohorte complète ( $n = 32$ ), nous avons réalisé les courbes de l'évolution des concentrations de pico-AMH pour les 16 patientes incluses dans notre étude (cf Figure n°16). Nous avons observé des profils évolutifs de pico-AMH **similaires** à ceux de l'étude préliminaire. En effet dans le groupe *fast recovery*, une augmentation rapide des concentrations d'AMH avait lieu à partir du temps AMH +3 jusqu'à atteindre un plateau du temps AMH +6 au temps AMH +12. Dans le groupe *slow recovery*, la vitesse d'augmentation des concentrations d'AMH était plus lente et ne permettait pas d'atteindre les taux d'AMH du groupe *fast recovery* au temps AMH +12. Les concentrations d'AMH étaient significativement plus élevées dans le groupe *fast recovery* au temps AMH+6 ( $p=0.0022$ ) et au temps AMH+9 ( $p=0.010$ ). Cependant nous

avons perdu la différence significative entre les concentrations d'AMH des deux groupes aux temps AMH +3 (NS) et AMH+12 ( $p=0.09$ ).



*Figure n°16 : Profil des courbes de pico-AMH, n = 16 patientes (8/8).*

Suite à nos premières analyses statistiques, nous avons observé un déséquilibre du nombre de patientes pour lesquelles nous disposions de **prélèvements aux 5 temps** entre le groupe Cyclée et le groupe Aménorrhée (cf Tableau n°2).

*Tableau n° 2 : Cohorte intermédiaire de 16 patientes. Nombre de patientes pour lesquelles les échantillons de sérum et de plasma EDTA étaient disponibles aux 5 temps dans chacun des 2 groupes (Cyclée versus Aménorrhée à + 6 mois).*

	Cyclée à 6 mois	Aménorrhée à 6 mois
<b>Sérum</b>	7/8 (87.5%)	3/8 (37.5%)
<b>Plasma EDTA</b>	8/8 (100%)	3/8 (37.5%)

C'est pourquoi, nous avons souhaité augmenter l'effectif du groupe Aménorrhée avec des patientes pour lesquelles les prélèvements étaient **disponibles aux 5 temps**. En

collaboration avec le service de Préservation de la Fertilité, nous avons été amenés à sélectionner **4 patientes supplémentaires** ayant été traitées pour un cancer du sein par le même protocole de CT (3 FEC-100 / 3 TAXOTERE) et bénéficiant d'un suivi à l'Observatoire de la Fertilité. Il est à noter que deux d'entre elles avaient reçu la CT en situation néo-adjuvante, contrairement aux autres patientes qui avaient d'abord été opérées puis traitées par CT adjuvante. **Au total**, notre population comprend donc **20 patientes**, à savoir **8 patientes** dans le groupe Cyclée, et **12 patientes** dans le groupe Aménorrhée (cf Tableau n°3).

*Tableau n°3 : Cohorte de 20 patientes. Nombre d'échantillons de sérum et de plasma EDTA disponibles à chaque temps et dans chaque groupe.*

	Sérum		Plasma EDTA	
	Cyclée (/8)	Aménorrhée (/12)	Cyclée (/8)	Aménorrhée (/12)
<b>AMH2</b>	8	10	8	10
<b>AMH+3</b>	7	12	8	12
<b>AMH+6</b>	8	12	8	12
<b>AMH+9</b>	8	11	8	12
<b>AMH+12</b>	8	9	8	9
<b>Nombre total d'échantillons</b>	39/40	54/60	40/40	55/60

A l'issue des dosages, nous avons remarqué qu'une patiente du groupe **Aménorrhée** présentait des concentrations de **leptine** inférieures à la limite de quantification du temps AMH+3 au temps AMH+12. Il s'est avéré que cette patiente avait perdu plus de 22 kg au décours de la CT dans un contexte d'**anorexie**. L'anorexie mentale étant responsable d'une aménorrhée hypothalamique fonctionnelle, ce qui représente un biais dans notre étude, nous avons choisi d'**exclure** la patiente à posteriori.

Les données cliniques et biologiques présentées ci-dessous portent donc sur notre **effectif final de 19 patientes** (Groupe **Cyclée** : **n=8** ; Groupe **Aménorrhée** : **n=11**).

c. Analyse statistique

Toutes nos analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel **GraphPad**.

Les variables **quantitatives** ont été décrites par la médiane (5<sup>ième</sup>, 95<sup>ième</sup> percentiles), et ont été comparées entre les groupes par un test de **Mann Whitney**. Les variables **qualitatives** ont été décrites par la fréquence relative (pourcentage), et ont été comparées entre les groupes par un test de **Fisher**. L'utilisation de tests **non paramétriques** était justifiée par le faible effectif de notre cohorte, la distribution de la population ne suivant pas une loi normale. Pour réaliser des **comparaisons multiples** (comparaison du temps AMH2 versus AMH+3/AMH+6/AMH+9/AMH+12), nous avons utilisé une **analyse de variance ANOVA** avec un **test de Friedman**. Ce test non paramétrique n'était réalisable que chez les patientes pour lesquelles les résultats des dosages étaient disponibles **à tous les temps**. Afin de rechercher des **corrélations** entre les différents paramètres dosés, nous avons effectué une analyse statistique à l'aide d'un test de **Spearman**.

d. Caractéristiques de la cohorte

Les caractéristiques de la cohorte au moment du diagnostic sont présentées dans le Tableau n°4 en fonction du statut Cyclée ou Aménorrhée des patientes au temps AMH+6. Les patientes du groupe **Cyclée** (n = 8) présentent **au diagnostic** un **BMI** (BMI T0) significativement **plus élevé** que les patientes du groupe **Aménorrhée** (n = 11), (médiane : **24.5** vs **21.0** kg/m<sup>2</sup>; **p = 0.0214**, Test de Mann Whitney). Le poids à AMH0 au moment du diagnostic semble donc conditionner la reprise des cycles en post-CT. Les comparaisons des autres caractéristiques clinico-biologiques au diagnostic n'étaient pas statistiquement significatives entre les deux groupes.

Parmi les 17 patientes candidates à une préservation de la fertilité sur 19, 11 en avaient bénéficié. La COS avait eu lieu dans l'intervalle libre entre la chirurgie et le début de la CT.

**Tableau n°4 : Caractéristiques clinico-biologiques de la cohorte finale (n = 19) au moment du diagnostic selon le statut menstruel à + 6 mois post-CT avec comparaison statistique (groupe Cyclée : n = 8, groupe Aménorrhée : n = 11).**

	<b>Cyclée à 6 mois</b>	<b>Aménorrhée à 6 mois</b>	<b>p =</b>
<b>Age</b> (années)	30.5 (24.8-34.7)	31.0 (25.5-34.5)	NS <sup>a</sup>
<b>AMH0</b> (pmol/l)	36.6 (6.8-97.6)	14.3 (7.0-57.7)	NS <sup>a</sup>
<b>BMI T0</b> (kg/m <sup>2</sup> )	<b>24,5</b> (21.1-28.0)	<b>21.0</b> (18.0-24.9)	<b>p = 0.0214</b> <sup>a</sup>
<b>Prise d'EP</b> (%)	50	36.4	NS <sup>b</sup>
<b>Tabagisme</b> (%)	50	9.1	NS <sup>b</sup>
<b>Statut RH +</b> (%)	50	36.4	NS <sup>b</sup>
<b>Préservation</b> (%)	50	63.6	NS <sup>b</sup>

EP : Oestro-progestatifs, RH + : Statut positif des Récepteurs Hormonaux de la tumeur. Les données de l'âge, de l'AMH et du BMI au diagnostic (AMH0, BMI T0) des patientes correspondent à la **Médiane (5<sup>ième</sup>, 95<sup>ième</sup> percentiles)**. Le tableau exprime la proportion de patientes sous oestro-progestatifs au moment du diagnostic / ayant une consommation tabagique / dont la tumeur exprimait les Récepteurs Hormonaux / ayant bénéficié d'une Préservation de la Fertilité, dans chaque groupe, sous forme de pourcentages . <sup>a</sup>Mann Whitney test, <sup>b</sup>Test de Fisher.

## 2. Méthode

### a. Nature des prélèvements

Nos dosages ont nécessité l'utilisation d'échantillons de **sérum** et de **plasma EDTA**. En théorie, nous disposions de 1.5 ml de sérum (ependorf blanc) et de 1.5 ml de plasma EDTA (ependorf bleu) conservés dans le cadre de la sérothèque/plasmathèque « follicule hémato » ou « protocole follicule » du CDCE.

A partir de l'ependorf blanc (sérum) ont été aliquotés :

- **300 µl** dans un tube à hémolyse pour le dosage de la **CRPus** et secondairement de **l'α1-AT**.
- **300 µl** dans un tube à hémolyse pour le dosage de la **leptine**.
- **100 µl** dans un microtube pour le dosage de la **SBP**.

Etant donné la quantité restreinte de sérum disponible, les 300 µL de sérum aliquotés pour le dosage de la **CRPus** ont permis dans un second temps le dosage de **l'α1-AT**. Les échantillons étaient conservés dans le réfrigérateur du secteur de métabolisme en attendant le dosage, ce paramètre étant stable 28 jours à + 4°C. Chez 6 patientes, la **SBP** a été dosée sur l'aliquot de sérum utilisé pour le dosage de la CRPus et de l'α1-AT. Pour 5 d'entre elles, il n'y avait plus de nouvel ependorf blanc disponible au CDCE.

Le dosage des cytokines s'est effectué à partir de l'ependorf bleu (plasma EDTA).

Le volume de plasma nécessaire était de **125 µl**.

b. Techniques de dosage des différents marqueurs

i. **CPRus**

La CRPus a été dosée **le jour de l'aliquotage** dans le laboratoire de Biochimie du CBPG, UF Pathologies des Protéines. Le dosage a été effectué par la technique d'immunonéphélométrie sensibilisée avec des particules de polystyrène, à l'aide du kit CardioPhase hsCRP (Référence OQIY) sur **néphélomètre BNII** (Siemens, Healthcare Diagnostics).

Principe : Des particules de polystyrène recouvertes d'un **anticorps monoclonal anti-CRP humaine** forment, lorsqu'elles sont mélangées à un échantillon contenant de la CRP, des **agrégats** sur lesquels une lumière est diffusée. **L'intensité de la lumière diffusée est proportionnelle à la concentration de CRP** de l'échantillon. En effet, l'intensité de la lumière diffusée est, dans certaines conditions, proportionnelle à la quantité de complexes antigène-anticorps dans l'échantillon. Si la quantité d'anticorps est maintenue à un niveau constant, le signal est proportionnel à la quantité d'antigènes. L'exploitation se fait par comparaison avec un standard de concentration connue.

Les dosages de CRP et de CRPus sont réalisés à partir de la même courbe de calibration mais le facteur de dilution des échantillons patients est plus élevé pour la CRP et la limite de quantification (Low Limit of Quantification : LLOQ) est plus faible pour la CRPus (**LLOQ CRPus = 0.16 mg/l** versus LLOQ CRP = 3.10 mg/l). La fidélité intermédiaire du dosage de la CRPus était d'environ 5,7 % sur la période de nos essais.

Des concentrations de CRPus comprises entre **3 et 6 mg/l** sont indicatives de l'existence d'un état inflammatoire de bas grade (**LGI**), tandis que le seuil **d'inflammation patente** est établi à **6 mg/l**.



## ii. Alpha-1 antitrypsine

L' $\alpha$ 1-AT a été dosée **dans les jours suivant l'aliquotage** (séries réalisées le lundi, mercredi et vendredi) à partir de l'aliquot utilisé pour le dosage de la CRPus. Le dosage pondéral de l' $\alpha$ 1-AT a été effectué par **immunoturbidimétrie** dans le service d'Hormonologie – Métabolisme – Nutrition - Oncologie du CBPG.

Le principe de ce test repose sur la précipitation en milieu liquide de l' $\alpha$ 1-AT par des anticorps spécifiques. Un excès d'antisérum spécifique anti- $\alpha$ 1-AT est ajouté aux échantillons de sérum dilués en milieu tamponné. Le trouble résultant de la formation de l'immun complexe « **protéine  $\alpha$ 1-AT / Ac spécifique anti- $\alpha$ 1-AT** » est mesuré par **spectrophotométrie** à  $\lambda = 340$  nm. La densité optique (**DO**) mesurée à cette longueur d'onde est **proportionnelle** à la **concentration** en  $\alpha$ 1-AT de l'échantillon. La concentration en  $\alpha$ 1-AT est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage obtenue à l'aide d'un sérum calibré en  $\alpha$ 1-AT (SpeciCal). Le dosage est réalisé à l'aide de la trousse  $\alpha$ 1-Antitrypsin (Référence 981928, Thermo Scientific) adaptée sur le Konelab 60 (Thermo Scientific) selon les recommandations du fournisseur. La fidélité intermédiaire du dosage pondéral de l' $\alpha$ 1-AT est comprise entre 3,75 et 3,88%.

Les valeurs de référence sont comprises entre **0,9 et 2 g/l**. En présence d'un **syndrome inflammatoire** et en l'absence de déficit constitutionnel ou acquis en  $\alpha$ 1-AT, les concentrations sériques s'élèvent au-delà de **2 g/l**.

## iii. Panel de cytokines

Le dosage du panel de cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ ) a été effectué au sein de l'Institut d'Immunologie du CBPG, avec le **Human High Sensitivity (HS) Cytokine Premixed Kit A (Référence FCST09)**, de chez **R&D Systems** (Bio-Techne), grâce à l'aide conjointe de deux techniciens de laboratoire (une technicienne de

l'Institut d'Immunologie et un technicien du service d'Hémostase-Transfusion). La lecture de la microplaque s'est effectuée sur le **Luminex 200**. La technologie du Luminex est fondée sur le principe de la cytométrie en flux. Le kit utilisé a été conçu pour la Recherche mais n'est pas encore utilisable pour le diagnostic en routine, et son coût est important.

Principe : Le HS Cytokine Premixed kit A permet l'**analyse simultanée de multiples cytokines** grâce à des **microbilles/microparticules** de polystyrène à code couleur **pré-enduites d'anticorps spécifiques**. Une étape de lavage élimine les microparticules ne s'étant pas liées puis un **cocktail d'anticorps biotinylés spécifiques** des substances à analyser est ajouté dans chaque puit. Une deuxième étape de lavage élimine tout anticorps ne s'étant pas fixé. Le **conjugué streptavidine-phycoérythrine (PE)** qui se lie aux anticorps biotinylés est ajouté à chaque puit. Une étape finale de lavage élimine la streptavidine-PE non liée. Les microparticules sont remises en suspension dans un tampon et la lecture se fait en utilisant **deux lasers** : un laser spécifique des microparticules qui détermine **quel analyte** est détecté, et un autre laser qui détermine l'amplitude du signal dérivé PE, celui-ci étant directement proportionnel à la **quantité d'analyte lié**.

Le support du dosage est une **microplaque de 96 puits**. Les dosages ont été effectués en **duplicate** pour tous les échantillons. Une étape préalable de dilution au demi de chaque échantillon Patient avec le diluent de calibrateur RD6-40 est nécessaire. Un **standard** de concentration connue est reconstitué avec le diluent de calibrateur RD6-40 puis des dilutions au quart sont réalisées en cascade afin d'obtenir la **gamme étalon**. Le diluent de calibrateur RD6-40 sert de **blanc**. Le logiciel **XPONENT software solutions** de Luminex calcule la **courbe de calibration de chaque cytokine** à partir de la mesure de l'**intensité de fluorescence moyenne (MFI)** des 7 points de calibration. Pour chaque échantillon, la mesure de la **MFI** permet, grâce à la courbe de calibration d'une cytokine donnée, de déterminer la **concentration** en cytokine correspondante. La qualité de l'analyse

du signal (MFI) par le Luminex dépend du compte de microbilles (« **trimmed count** ») dénombré par puit, le nombre minimal d'évènements garantissant une bonne précision pour une cytokine donnée étant fixé à **50 microbilles**. Selon les données du fournisseur, la **LLOQ** est définie par la valeur du point de calibration le plus bas, et la High Limit of Quantification (**HLOQ**) par la valeur du point de calibration le plus élevé (cf Tableau n°5). Afin d'évaluer la performance du HS Cytokine Premixed kit A dans notre étude, nous avons réalisé une étude complémentaire de détermination de la LLOQ intégrant les dosages des trois séries.

Trois niveaux de **contrôles de qualité interne (CQI) bas, moyen, et haut** (QC11, Set 889) ont permis la validation analytique de chaque série et de chaque paramètre. Des **valeurs cibles de CQI** sont indiquées par le fournisseur. Les **coefficients de variation (CV) limites** autorisés par Bio-technie par rapport à ces valeurs cibles sont de l'ordre de  $\pm 20 \%$  pour les niveaux de **CQI moyen et haut**, et  $\pm 30 \%$  pour le niveau de **CQI bas** (acceptation des CQI jusqu'à des valeurs égales à 20 % ou 30 % respectivement). Nous avons ainsi calculé pour chaque niveau de CQI et pour chaque cytokine les **bornes acceptables** des CQI (limite inférieure / limite supérieure par rapport à la valeur cible de CQI attendue).

Nous avons un total de **95 échantillons patientes à tester**, ce qui a nécessité la réalisation de **trois séries** avec le HS Cytokine Premixed kit A. En effet, sur chaque microplaque, 16 puits étaient consacrés aux calibrants, 6 puits aux CQI, et 74 puits étaient dédiés à nos patientes ce qui permettait de doser **37 échantillons patientes par série**. Les puits libres restants ont permis soit de doser des CQI en fin de plaque, soit de réaliser des vérifications d'une série précédente.

**Tableau n°5 : LLOQ et HLOQ du HS Cytokine Premixed kit A annoncées par le fournisseur.**

	<b>LLOQ fournisseur (pg/ml)</b>	<b>HLOQ fournisseur (pg/ml)</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	0.32	1300
<b>IL-4</b>	1.81	7400
<b>IL-6</b>	0.83	3400
<b>IL-8</b>	0.74	3045
<b>IL-10</b>	0.42	1700
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0.76	3100

**i. SBP**

La SBP a été dosée **le jour de l’aliquotage** sur l’**Immulite 2000** (Siemens), par un dosage automatisé **immunométrique, chimiluminescent** avec amplification enzymatique, en deux étapes, en phase solide (Référence L2KSH2) dans le service d’Hormonologie – Métabolisme – Nutrition - Oncologie du CBPG.

Principe : Le dosage repose sur l’utilisation de billes de polystyrène recouvertes d’**anticorps monoclonaux murins anti-SBP**. Un anticorps polyclonal de lapin anti-SBP marqué à la phosphatase alcaline (**conjugué**) est ajouté au mélange réactionnel. Il se forme un **sandwich** en présence de SBP. Après une étape d’incubation à 37°C et de lavage, le **substrat** de l’enzyme est ajouté créant ainsi une réaction de chimiluminescence. La **lumière** mesurée est **proportionnelle** à la quantité d’**antigènes** de l’échantillon. La fidélité intermédiaire de ce dosage est comprise entre 5,48 et 6,22%. La reproductibilité inter-laboratoire est de 7,7 %.

Les valeurs de référence de SBP chez des femmes âgées de 21 à 40 ans s’étendent de **16,8 à 315 nmol/l**.

## ii. Leptine

Les aliquots de leptine ont été **recongelés à -80°C pour dosage ultérieur** dans le service d'Endocrinologie – Métabolisme – Nutrition - Oncologie du CBPG.

La technique utilisée est une méthode **ELISA (TECO Leptine**, référence TE1015 distribué par TECO medical Group) de type sandwich qui utilise **deux anticorps monoclonaux spécifiques** et de forte affinité. La leptine présente dans les échantillons se lie d'abord au premier anticorps fixé sur la microplaque. Lors de l'étape suivante, le deuxième anticorps spécifique de la leptine se lie à son tour à la leptine immobilisée. Le second anticorps est biotinylé et sera incubé avec le **conjugué** enzymatique Streptavidine-Péroxydase. Lors de la réaction avec le **substrat**, le changement de couleur est catalysé de façon quantitative, en fonction de la quantité de leptine présente dans les échantillons. Le dosage de chaque échantillon a été effectué en **duplicate**.

Les valeurs de leptine attendues pour une femme ayant un **BMI entre 18 et 29 kg/m<sup>2</sup>** (intervalles des valeurs de BMI au temps AMH2) sont comprises entre **1.81 et 50.4 ng/ml**.



# Résultats

## 1. Résultats analytiques des dosages de cytokines

### a. Contrôles de qualité interne

Pour chaque cytokine et chaque niveau de CQI, les valeurs mesurées étaient situées dans la limite des bornes acceptables, à l'exception du niveau 3 de l'IL-6 au cours de la troisième série (CV de 22%), (cf Tableau n°6). Cependant, comme les valeurs des échantillons patients que nous avons dosés correspondaient au niveau 1, la validation analytique des résultats de l'IL-6 n'était pas impactée.

*Tableau n° 6 : Nombre de séries sur le Luminex 200 pour lesquelles les CQI se situaient dans la limite des bornes acceptables.*

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	3/3	3/3	3/3
<b>IL-4</b>	3/3	3/3	3/3
<b>IL-6</b>	3/3	3/3	<b>2/3</b>
<b>IL-8</b>	3/3	3/3	3/3
<b>IL-10</b>	3/3	3/3	3/3
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	3/3	3/3	3/3

### b. Profils de précision

Le **profil de précision** a été réalisé à partir des échantillons patients dosés dans les **trois séries**. Pour chaque échantillon et chaque cytokine, nous disposons d'une concentration définie comme moyenne des concentrations de deux puits, associée à un CV entre ces deux valeurs. Les **concentrations** associées à leurs **CV** ont été regroupées pour chaque paramètre par **classes de valeurs croissantes**. Nous avons ainsi formé pour chaque cytokine **6 à 8 classes** comprenant de 5 à 17 valeurs, avec une **concentration moyenne de cytokine** et un **CV moyen par classe**. La courbe du profil de précision a été tracée pour chaque cytokine (cf Figures n°17 à 22) à partir des différents tableaux de valeurs (voir

Tableaux n°7 à 12). Le modèle de **courbe polynomiale** est le plus représentatif de la distribution des points. La **LLOQ** a été mesurée comme la concentration en cytokine pour laquelle le **CV moyen** est égal à **20%**. Pour l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-10, nous avons mesuré une LLOQ plus basse que celle annoncée par le fournisseur, contrairement à l'IL-4 pour laquelle la LLOQ est largement supérieure à celle attendue. Pour l'IL-8 et le TNF- $\alpha$ , la LLOQ n'est pas déterminable (ND) sur le profil de précision car les CV des trois séries sont bas.

### i. Interleukine-1 $\beta$

**Tableau n°7 : Résultats complets des dosages de l'IL-1 $\beta$  sur le Luminex 200 (exprimés en pg/ml) triés en 8 classes, permettant la réalisation du profil de précision. [C] = concentration.**

Classe 1		Classe 2		Classe 3		Classe 4	
0,103 - 0,175		0,176 – 0,299		0,300 – 0,410		0,411 – 0,609	
[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)
0,103	0	0,176	12,49	0,3	0	0,411	23,075
0,112	25,086	0,206	23,075	0,306	16,87	0,422	3,759
0,132	30,65	0,214	89,251	0,306	16,87	0,433	14,671
0,132	30,65	0,215	0	0,313	44,349	0,433	14,671
0,132	30,65	0,245	16,402	0,322	0	0,456	7,009
0,147	42,296	0,257	0	0,344	18,078	0,478	0
0,155	5,034	0,267	40,007	0,344	18,078	0,501	0
0,155	5,03	0,269	0	0,355	4,396	0,57	11,438
				0,375	39,708	0,57	22,85
				0,385	82,65		
<b>[C] moyenne</b>	0,133	<b>[C] moyenne</b>	0,231	<b>[C] moyenne</b>	0,335	<b>[C] moyenne</b>	0,475
<b>CV moyen</b>	21,2	<b>CV moyen</b>	22,7	<b>CV moyen</b>	24,1	<b>CV moyen</b>	10,8
Classe 5		Classe 6		Classe 7		Classe 8	
0,610-1,009		1,010 - 2,262		2,263 - 3,263		3,264 - 5,018	
[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)
0,61	14,856	1,01	4,188	2,263	3,274	3,264	2,439
0,804	4,184	1,1	7,629	2,504	7,964	3,413	2,258
0,828	4,074	1,118	3,101	2,899	9,614	3,645	11,482
0,898	16,888	1,143	0	2,9	5,233	3,659	2,121
0,899	0	1,18	4,431	2,953	5,147	5,018	0,397
0,9	11,329	1,242	0				
		1,276	6,481				
		1,279	4,119				
		1,305	15,822				
		1,422	8,651				
		1,71	2,368				
<b>[C] moyenne</b>	0,823	<b>[C] moyenne</b>	1,253	<b>[C] moyenne</b>	2,704	<b>[C] moyenne</b>	3,8
<b>CV moyen</b>	8,6	<b>CV moyen</b>	5,2	<b>CV moyen</b>	6,2	<b>CV moyen</b>	3,7



Nous observons un CV moyen supérieur à 20 % pour les classes n°1 à 3 (concentrations moyennes de 0.133, 0.231 et 0.335 pg/ml), (cf Tableau n°7). A partir de la classe n°4, le CV passe sous le seuil des 20 % (CV moyen de 10.8 % pour une concentration moyenne de 0.475 pg/ml). Ensuite les CV moyens sont toujours sous ce seuil. A partir de la courbe polynomiale (cf Figure n°17), nous mesurons une **LLOQ à 0.25 pg/ml**, soit légèrement inférieure à celle annoncée par le fournisseur (qui était de 0.32 pg/ml).

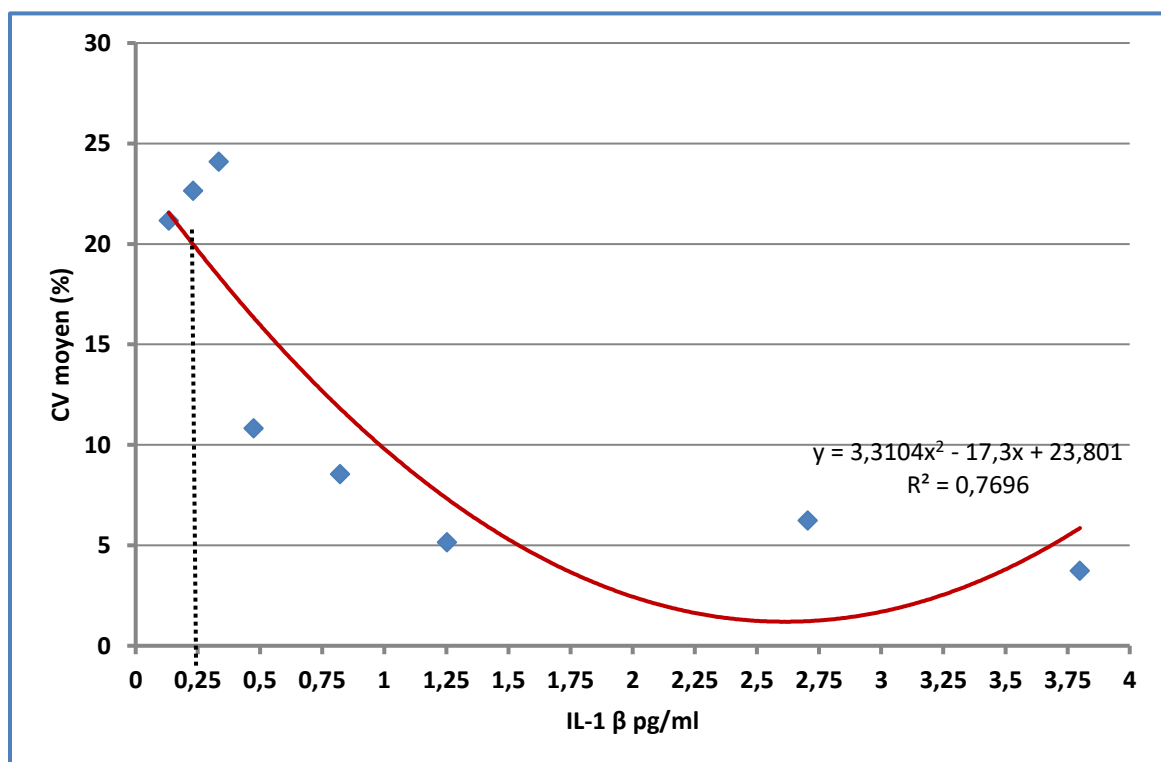


Figure n°17 : Profil de précision du dosage de l'IL-β sur le Luminex 200.

## ii. Interleukine-6

**Tableau n° 8 : Résultats complets des dosages de l'IL-6 sur le Luminex 200 (exprimés en pg/ml) triés en 8 classes, permettant la réalisation du profil de précision. [C] = concentration.**

Classe 1		Classe 2		Classe 3		Classe 4	
0,104 - 0,313		0,314 - 0,541		0,542 - 0,707		0,708 - 1,023	
[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)
0,104	0	0,314	45,49	0,542	0	0,708	11,079
0,105	75,023	0,322	0	0,542	0	0,709	33,219
0,105	75,023	0,327	23,968	0,542	0	0,769	10,157
0,105	75,023	0,327	23,968	0,548	14,266	0,811	0
0,131	29,042	0,327	23,968	0,548	14,266	0,811	0
0,16	0	0,377	20,606	0,57	47,973	0,811	0
0,188	20,606	0,382	0	0,598	13,097	0,931	8,469
0,216	36,325	0,487	16,015	0,598	13,097	0,987	0
0,271	0	0,487	16,015	0,598	13,097	0,987	15,994
0,271	0			0,598	39,263		
				0,598	13,097		
				0,601	116,851		
				0,625	31,303		
				0,653	0		
				0,653	0		
				0,659	11,865		
<b>[C] moyenne</b>	0,166	<b>[C] moyenne</b>	0,372	<b>[C] moyenne</b>	0,592	<b>[C] moyenne</b>	0,836
<b>CV moyen</b>	31,1	<b>CV moyen</b>	18,9	<b>CV moyen</b>	20,5	<b>CV moyen</b>	8,8
Classe 5		Classe 6		Classe 7		Classe 8	
1,024 - 1,209		1,210 - 1,433		1,434 - 2,087		2,088 - 5,739	
[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)
1,024	29,394	1,21	13,084	1,434	0	2,088	0
1,024	29,394	1,237	0	1,434	0	2,111	0
1,024	29,394	1,237	0	1,449	20,762	2,301	13,091
1,024	29,394	1,237	0	1,449	20,762	2,62	3,062
1,098	0	1,237	0	1,449	20,762	2,727	11,053
1,154	6,854	1,237	0	1,662	0	2,94	0
1,156	0	1,237	0	1,662	0	2,94	0
1,156	0	1,237	0	1,662	0	4,024	0
		1,237	0	1,763	4,426	5,739	24,822
		1,237	0	1,875	16,055		
<b>[C] moyenne</b>	1,083	<b>[C] moyenne</b>	1,234	<b>[C] moyenne</b>	1,584	<b>[C] moyenne</b>	3,054
<b>CV moyen</b>	15,6	<b>CV moyen</b>	1,3	<b>CV moyen</b>	8,3	<b>CV moyen</b>	5,8

Nous observons un CV moyen à 31.1 % pour la classe n°1 (concentration moyenne de 0.166 pg/ml) et autour de 20 % pour les classes n° 2 et 3 (concentrations moyennes de 0.372 et 0.592 pg/ml), (cf Tableau n°8). Ensuite à partir de la classe n°4, les CV moyens sont toujours sous le seuil des 20 %. A partir de la courbe polynomiale (cf Figure n°18), nous mesurons une **LLOQ à 0.51 pg/ml**, soit légèrement inférieure à celle annoncée par le fournisseur (qui était de 0.83 pg/ml).

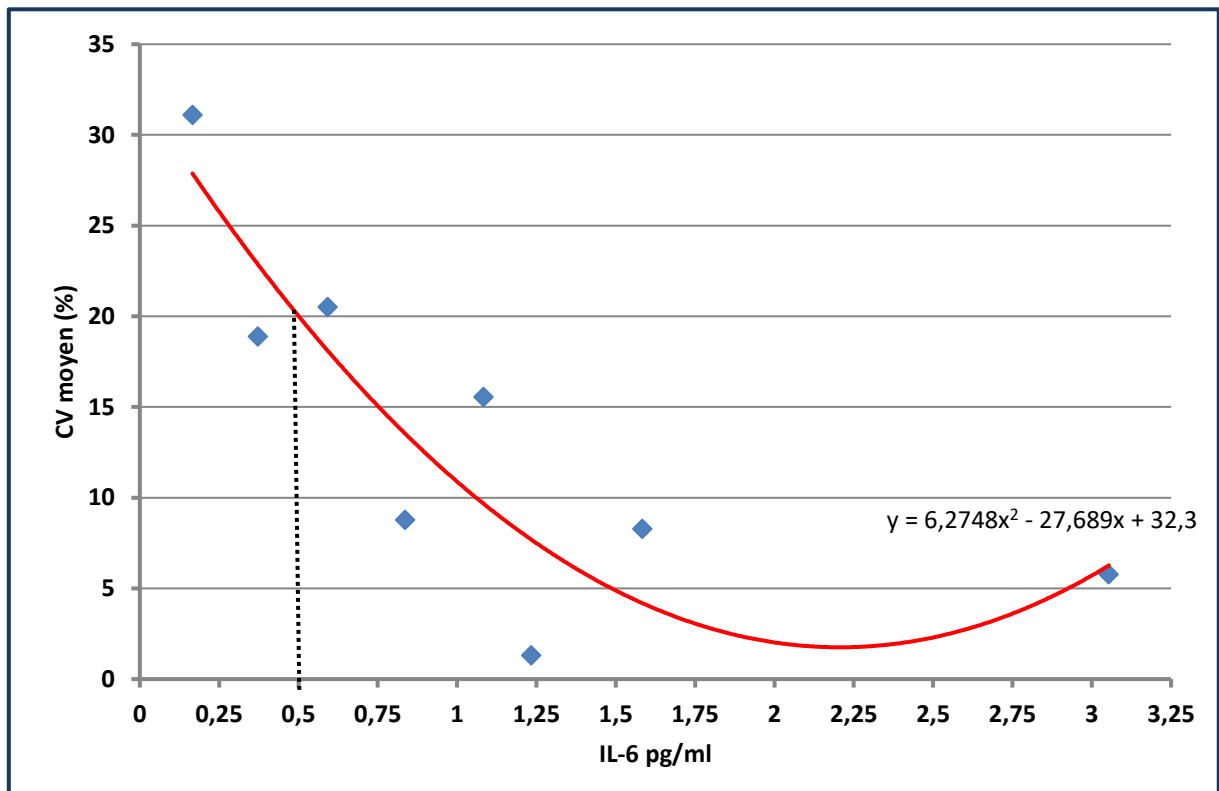
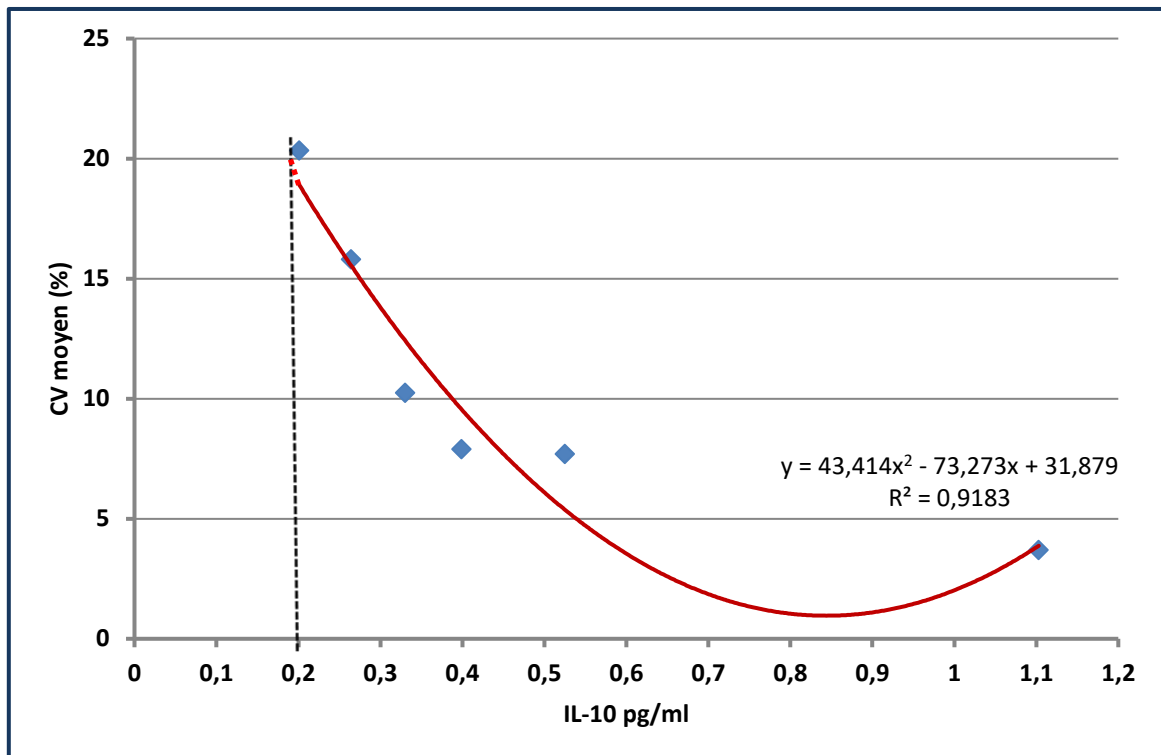


Figure n°18 : Profil de précision du dosage de l'IL-6 sur le Luminex 200.



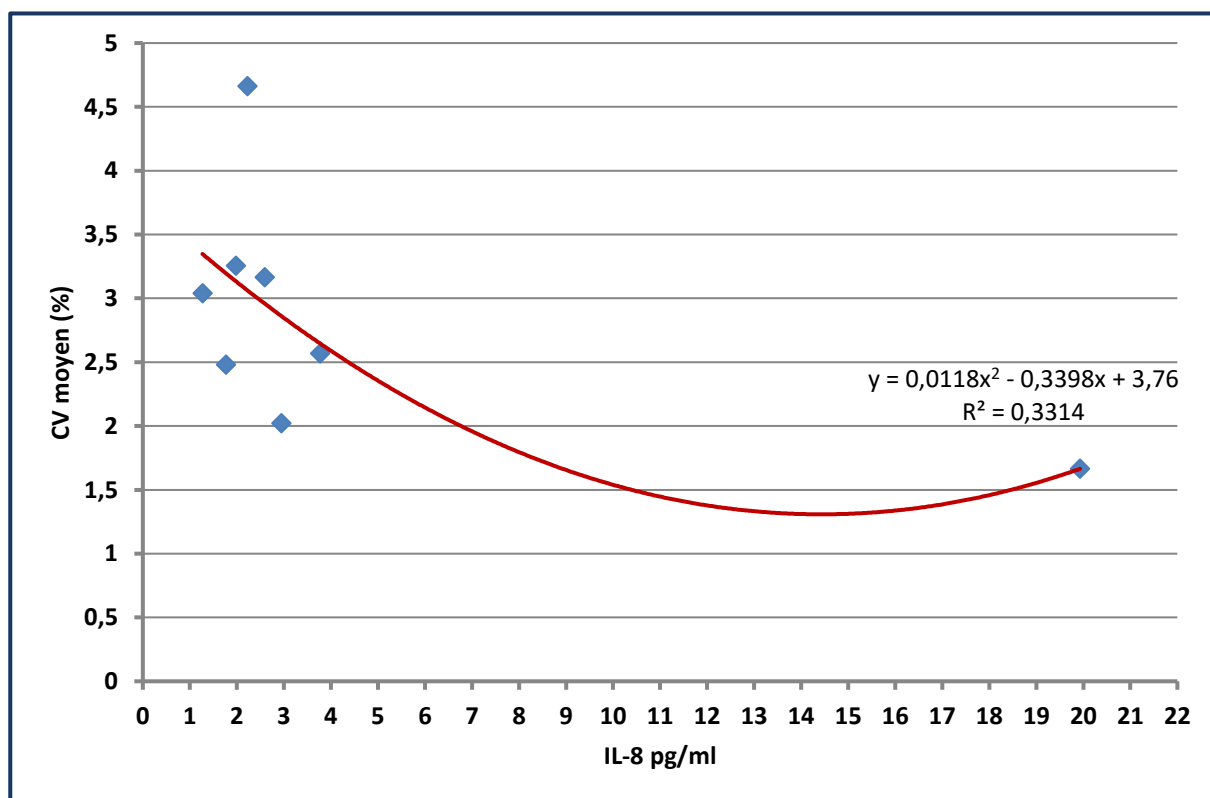
Nous observons un CV moyen à 20.3 % pour la classe n°1 (concentration moyenne de 0.201 pg/ml), (cf Tableau n°9). Ensuite à partir de la classe n°2, les CV moyens diminuent progressivement. A partir de la courbe polynomiale (cf Figure n°19), nous mesurons une **LLOQ à 0.20 pg/ml**, soit légèrement inférieure à celle annoncée par le fournisseur (qui était de 0.42 pg/ml).



*Figure n°19 : Profil de précision du dosage de l'IL-10 sur le Luminex 200.*



Pour l'IL-8, nous observons des CV moyens compris entre 4.7 et 1.7 %, correspondant à des concentrations moyennes allant de 1.268 à 19.931 pg/ml (cf Tableau n°10). Sur le profil de précision (cf Figure n°20), nous ne pouvons déterminer la **LLOQ**, qui est donc **inférieure** à la plus petite valeur mesurée, soit **0.906 pg/ml**. Pour rappel, la LLOQ annoncée par le fournisseur était de 0.74 pg/ml.



*Figure n°20 : Profil de précision du dosage de l'IL-8 sur le Luminex 200.*

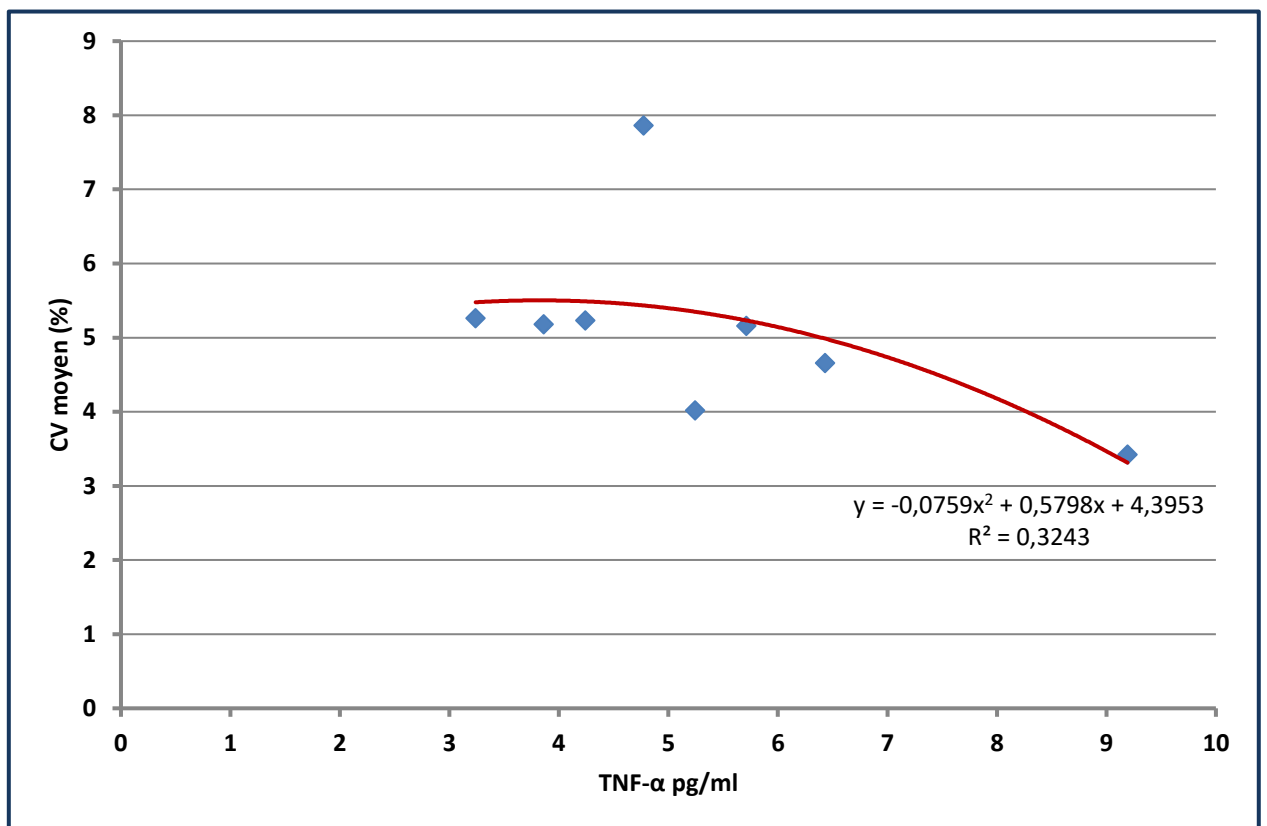
v. **Tumor necrosis factor- $\alpha$**

**Tableau n°11 : Résultats complets des dosages du TNF- $\alpha$  sur le Luminex 200 (exprimés en pg/ml) triés en 8 classes, permettant la réalisation du profil de précision. [C] = concentration.**

Classe 1		Classe 2		Classe 3		Classe 4	
2,767 - 3,710		3,711 - 4,026		4,027 - 4,684		4,685 - 5,003	
[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)
2,767	0	3,711	13,119	4,027	4,955	4,685	4,295
3,045	6,243	3,712	2,623	4,056	0	4,727	0
3,088	6,398	3,744	5,377	4,11	4,994	4,734	12,107
3,169	6,478	3,918	4,948	4,188	23,037	4,735	4,034
3,367	5,829	3,918	4,948	4,309	4,595	4,735	4,034
3,445	0	3,964	10,417	4,328	0	4,756	6,333
3,505	11,164	3,965	0	4,328	0	4,859	20,094
3,523	5,965	3,965	0	4,588	4,284	4,863	12,044
						4,869	7,829
<b>[C] moyenne</b>	3,239	<b>[C] moyenne</b>	3,862	<b>[C] moyenne</b>	4,242	<b>[C] moyenne</b>	4,774
<b>CV moyen</b>	5,3	<b>CV moyen</b>	5,2	<b>CV moyen</b>	5,2	<b>CV moyen</b>	7,9
Classe 5		Classe 6		Classe 7		Classe 8	
5,004 - 5,527		5,528 - 6,078		6,079 - 7,158		7,159 - 11,878	
[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)	[C] (pg/ml)	CV (%)
5,004	3,8	5,528	3,55	6,079	3,182	7,159	2,635
5,108	7,776	5,528	3,55	6,089	6,243	7,483	6,198
5,11	0	5,54	3,405	6,204	6,028	7,689	7,283
5,138	7,387	5,54	3,405	6,204	6,028	8,476	2,17
5,14	3,773	5,549	6,927	6,204	0	8,552	4,263
5,276	7,329	5,549	6,927	6,223	9,141	9,104	1,991
5,277	0	5,805	9,714	6,224	3,046	10,878	3,263
5,406	6,993	5,939	6,319	6,224	3,046	11,521	1,524
5,407	0	5,941	6,534	6,424	4,41	11,878	1,479
5,413	3,561	5,955	3,2	6,491	2,906		
5,413	3,561	5,955	3,2	6,624	5,682		
				6,756	8,338		
				6,758	2,778		
				6,758	2,778		
				6,758	2,778		
				6,862	8,11		
<b>[C] moyenne</b>	5,245	<b>[C] moyenne</b>	5,712	<b>[C] moyenne</b>	6,430	<b>[C] moyenne</b>	9,193
<b>CV moyen</b>	4,0	<b>CV moyen</b>	5,2	<b>CV moyen</b>	4,7	<b>CV moyen</b>	3,4



Les CV moyens des dosages de TNF- $\alpha$  sont compris entre 7.9 et 3.4 % pour des concentrations moyennes comprises entre 3.239 et 9.193 pg/ml (cf Tableau n°11). Sur la courbe polynomiale que nous avons tracée (cf Figure n°21), nous ne pouvons déterminer la **LLOQ**, qui est donc **inférieure** à la plus petite valeur mesurée, soit **2.767 pg/ml**. Pour rappel, la LLOQ annoncée par le fournisseur était de 0.76 pg/ml.



*Figure n°21 : Profil de précision du dosage du TNF- $\alpha$  sur le Luminex 200.*



la courbe polynomiale (cf Figure n°22), nous mesurons une **LLOQ à 14.0 pg/ml**, soit largement **supérieure** à celle annoncée par le **fournisseur** (qui était de 1.81 pg/ml).

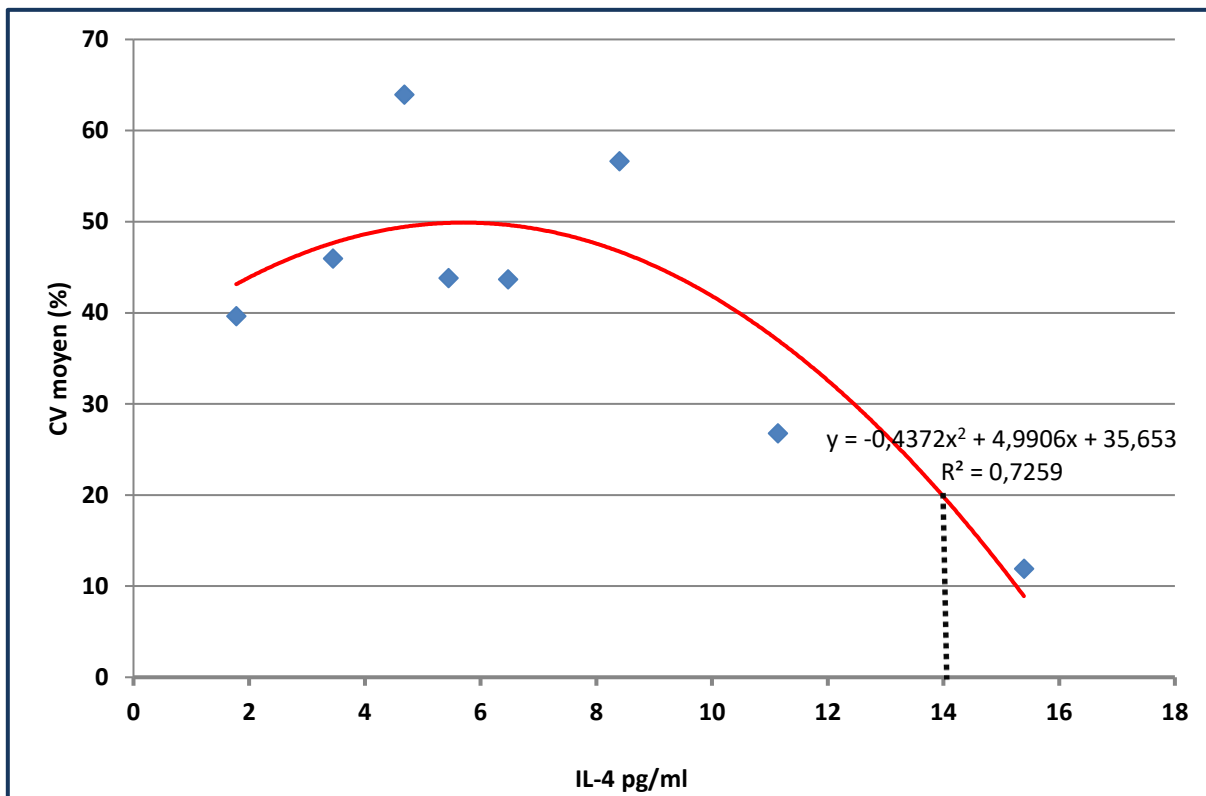


Figure n°22 : Profil de précision du dosage de l'IL-4 sur le Luminex 200.

#### vii. Conclusion sur les limites de quantification du panel de cytokines

L'**IL-1 $\beta$** , l'**IL-6** et l'**IL-10** apparaissent comme des **paramètres robustes** avec une sensibilité fonctionnelle mesurée **basse et très proche** de celle annoncée par le **fournisseur**. A contrario, la limite de quantification de l'**IL-4** est 7.7 fois supérieure à celle annoncée par Bio-Techne, ce qui en fait un **paramètre très peu fiable** aux concentrations mesurées dans nos trois séries. Nous ne pouvons confirmer les LLOQ de l'**IL-8** et du **TNF- $\alpha$**  annoncées par le fournisseur car elles ne sont **pas déterminables** sur le profil de précision. Cependant, dans la gamme des concentrations que nous avons mesurées chez nos patientes, les CV moyens de ces deux cytokines sont inférieurs à 8 %, ce qui en fait des paramètres également **robustes** dans notre étude.

c. Limites de la technologie Luminex

Concernant la technologie **Luminex**, un problème technique est survenu au cours de deux séries lors de l'**étape de lavage** sur **certains puits** de la microplaque (aspiration difficile sur le collecteur de vide). Ceci était responsable d'un **compte de microbilles insuffisant** lors de la lecture par le cytomètre. Ainsi, soit l'échantillon patiente a été analysé en **simple** (un puits sur deux correctement lavé pour 8 échantillons du groupe Cyclée et 6 échantillons du groupe Aménorrhée), soit il a été **exclu de l'analyse** (deux puits sur deux concernés par le problème technique pour 3 échantillons du groupe Aménorrhée).

Comme mentionné ci-dessus, la **limite de quantification** du dosage de l'**IL-4** étant très élevée, nous n'avons pas inclus tous les échantillons patientes lors de l'analyse statistique de l'IL-4 à cause de **CV trop importants**.

Une autre limite des études statistiques est la présence de nombreux **échantillons de cytokines** ayant présenté un **taux inférieur aux sensibilités fonctionnelles**. Pour chaque cytokine étudiée, nous avons choisi de supposer que les valeurs trouvées en dessous des seuils de la sensibilité fonctionnelle du fournisseur suivaient une **distribution Normale centrée sur la moitié de cette sensibilité fonctionnelle**. Par exemple, pour l'IL-6, les valeurs inférieures à la LLOQ annoncée par le fournisseur ( $< 0.83$  pg/ml), ont été considérées comme égales à  $0.415$  pg/ml ( $0.83$  pg/ml / 2).

## 2. Etude clinico-biologique

### a. Préambule

Nous n'avons pas pu recueillir auprès des oncologues ayant suivi les patientes toutes les données de **BMI** au temps **AMH2** (données manquantes chez une patiente du groupe Cyclée et chez trois patientes du groupe Aménorrhée).

Les dosages de **CRP**, de **SBP** et de **leptine** ont été réalisés pour tous les échantillons patientes disponibles au CDCE. Un dosage d' **$\alpha$ 1-AT** manquait à AMH2 chez une patiente du groupe Aménorrhée (prélèvement en quantité insuffisante).

Les comparaisons inter-groupes présentées dans cette partie sont illustrées par des courbes, représentant pour chaque groupe et chaque temps, la **moyenne** ainsi que l'**écart-type réduit** (Standard Error of the Mean : SEM). Sur les figures illustrant la **distribution des valeurs** d'un marqueur dans chaque groupe à un temps donné, nous avons représenté la **médiane** du marqueur étudié sous forme de barre horizontale.

### b. Paramètres inflammatoires

#### i. **Etude de la CRP**

Les concentrations de CRP mesurées chez nos patientes sont situées majoritairement **en-dessous du seuil d'inflammation patente**. En effet, tous temps confondus, la médiane des valeurs de CRP est de **1.1 mg/l** dans le groupe **Cyclée** (n = 39, minimum : < 0.16 mg/l ; maximum : 7.72 mg/l) et de **0.7 mg/l** dans le groupe **Aménorrhée** (n = 49, minimum : < 0.16 mg/l ; maximum : 7.17 mg/l). Cette différence est **statistiquement significative** lorsqu'on compare les deux groupes avec le test non paramétrique de Mann Whitney (**p = 0.0061**).

## 1. Comparaison inter-groupe

On observe que les moyennes des valeurs de CRPus se situent en dessous du seuil d'inflammation patente (6 mg/l), et même **en dessous du seuil de LGI** (3 mg/l) dans les deux groupes et à tous les temps. Au temps **AMH+6**, les concentrations de CRPus tendent à être **plus élevées** dans le groupe **Cyclée** (n = 8) comparé au groupe Aménorrhée (n = 11), avec une différence proche de la significativité (**p=0.0903**, Mann Whitney Test). L'écart entre les deux groupes diminue ensuite jusqu'au temps AMH+12 où les deux courbes se rejoignent (cf Figures n°23 et 24).

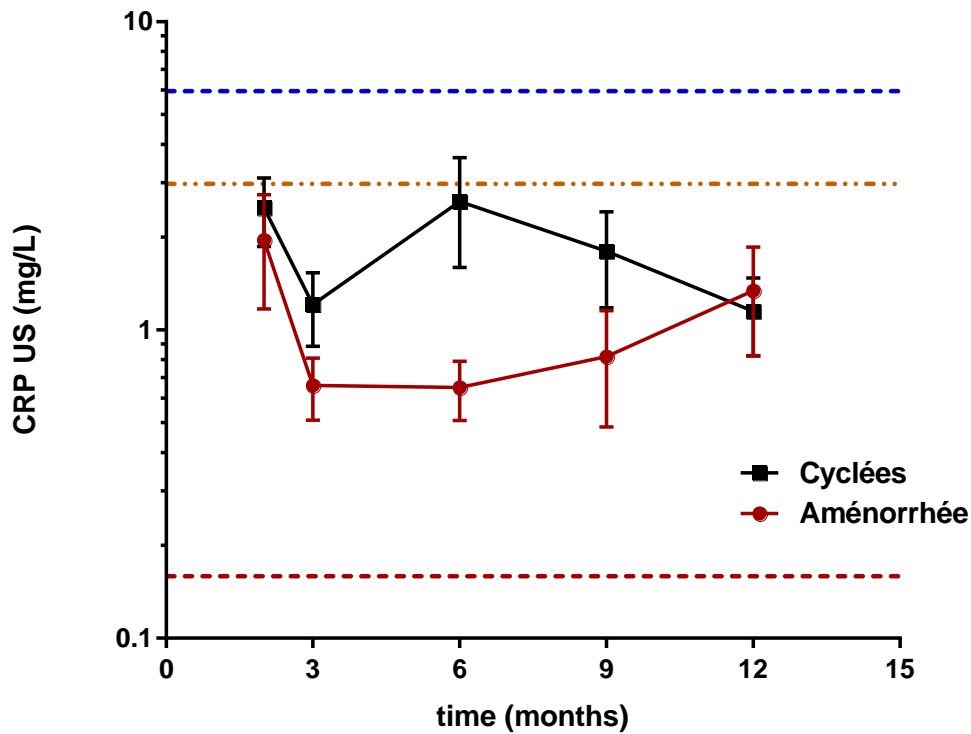
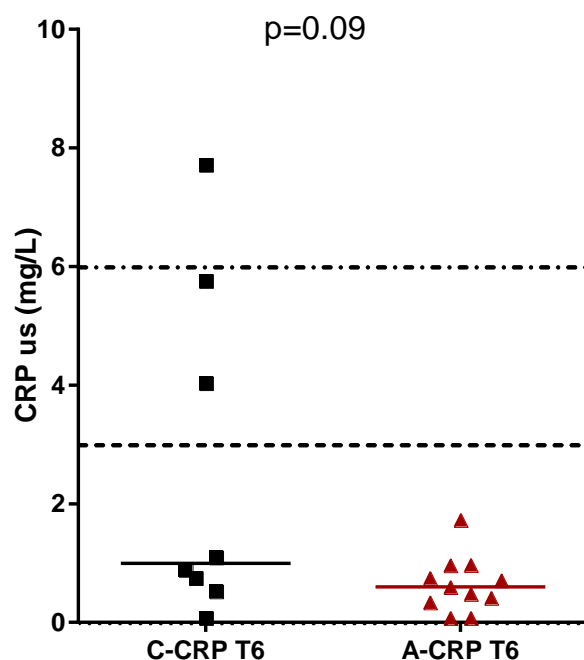


Figure n°23 : Profils évolutifs des concentrations plasmatiques de CRPus (moyenne  $\pm$  SEM ; LLOQ, seuil de LGI, seuil d'inflammation patente).

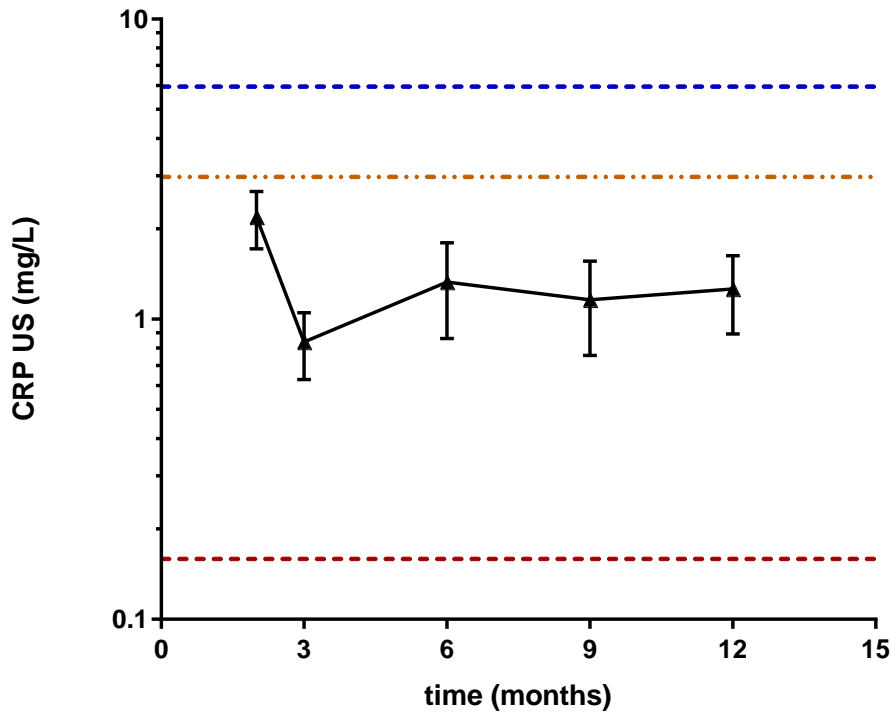


**Figure n°24 : Distribution des valeurs de CRPus à AMH+6 dans chacun des deux sous-groupes (C : Cyclée ; A : Aménorrhée ; barre horizontale : médiane ; seuil de LGI ---- , seuil d'inflammation patente .....).**

## 2. Comparaison multiple

Nous avons comparé par analyse de variance (test de Friedman) les valeurs de CRPus mesurées aux **différents temps par rapport au temps AMH2**. Ce test statistique n'est réalisable que chez les patientes pour lesquelles les dosages sont disponibles aux cinq temps. L'analyse a été réalisée dans l'effectif global (Cyclée + Aménorrhée, n = 13, cf Figure n°25), puis dans le groupe Cyclée (n = 7), et enfin dans le groupe Aménorrhée (n = 6). Les concentrations de CRPus mesurées à **AMH+3, AMH+6, AMH+9** ou **AMH+12** ne sont **pas significativement différentes** des concentrations de CRPus mesurées à **AMH2**, que ce soit lorsque l'analyse de variance est réalisée dans la population globale (n = 13) ou dans chacun des deux sous-groupes (Cyclée : n = 7, Aménorrhée : n = 6). Les

concentrations plasmatiques de **CRPus n'évoluent donc pas** significativement au cours de la **première année post-CT**.



*Figure n°25 : Evolution des concentrations plasmatiques de CRPus des patientes (Cyclée + Aménorrhée) avec données complètes (5 temps,  $n = 13$ ), (moyenne  $\pm$  SEM ; LLOQ, seuil de LGI, seuil d'inflammation patente).*

## ii. A1-AT

Les valeurs d' $\alpha$ 1-AT se situent **en dessous du seuil inflammatoire** (2 g/l) et sont superposables dans les deux groupes tout au long du suivi (cf Figure n°26). La comparaison inter-groupe par test de Mann Whitney n'a **pas** mis en évidence **de différence** statistiquement significative.



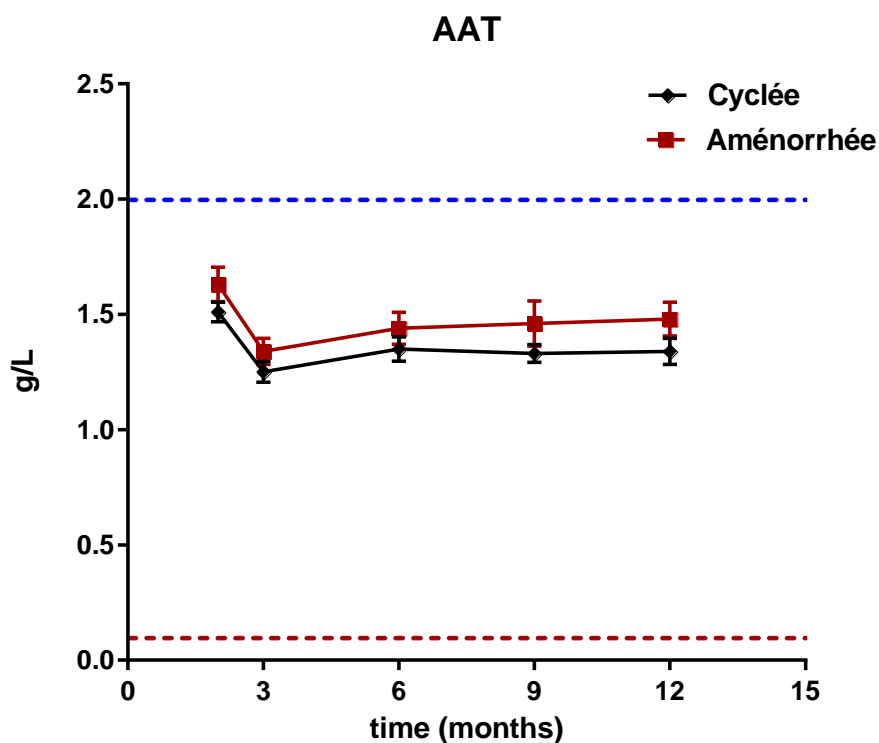


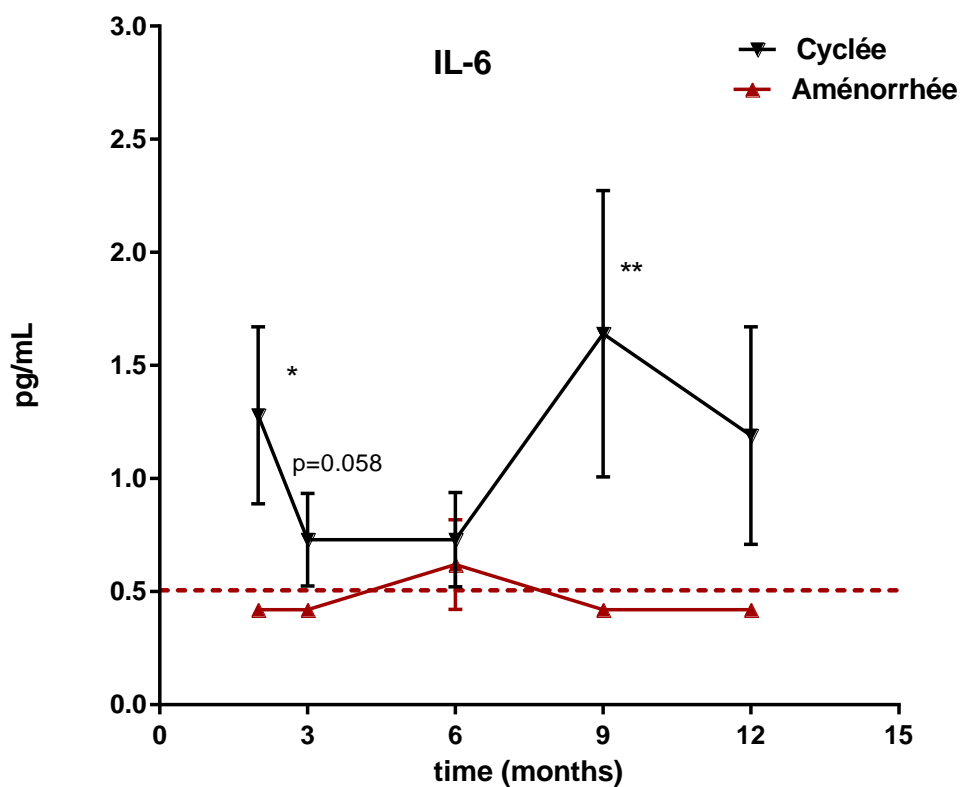
Figure n°26 : Profils évolutifs des concentrations plasmatiques d' $\alpha$ 1-AT (moyenne  $\pm$  SEM ; LLOQ, seuil d'inflammation).

### iii. Interleukine-6

#### 1. Comparaison inter-groupe

Chez les patientes du groupe **Aménorrhée**, les valeurs d'IL-6 sont **basses** (inférieures à la LLOQ) et relativement **stables** au cours de la première année post-CT avec une courbe qui apparaît plate. Tandis que chez les patientes ayant retrouvé des **cycles menstruels à 6 mois post-CT**, les concentrations moyennes d'IL-6 semblent **plus variables**. Les valeurs d'IL-6 mesurées au temps **AMH2** chez les patientes du groupe **Cyclée** (n = 8) sont significativement **plus élevées** que celles des patientes du groupe Aménorrhée (n = 9), (**p = 0.0294**, Mann Whitney). Au temps **AMH+3**, les concentrations plasmatiques d'IL-6 tendent également à être plus élevées dans le groupe Cyclée (n = 8) par

rapport aux patientes du groupe Aménorrhée (n = 11) avec une différence proche de la significativité ( $p = 0.0578$ , Mann Whitney). Les deux courbes se rejoignent au temps AMH+6 puis elles s'éloignent de nouveau au temps AMH+9 avec une différence statistiquement significative (Cyclée : n = 8 ; Aménorrhée : n = 9 ;  $p = 0.009$ , Mann Whitney) et au temps AMH+12 avec une différence proche de la significativité (Cyclée : n = 8 ; Aménorrhée : n = 7 ;  $p = 0.0769$ , Mann Whitney), (cf Figures n°27 et 28).



**Figure n°27 : Profils évolutifs des concentrations plasmatiques d'IL-6 (moyenne  $\pm$  SEM ; LLOQ déterminée avec le profil de précision, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).**

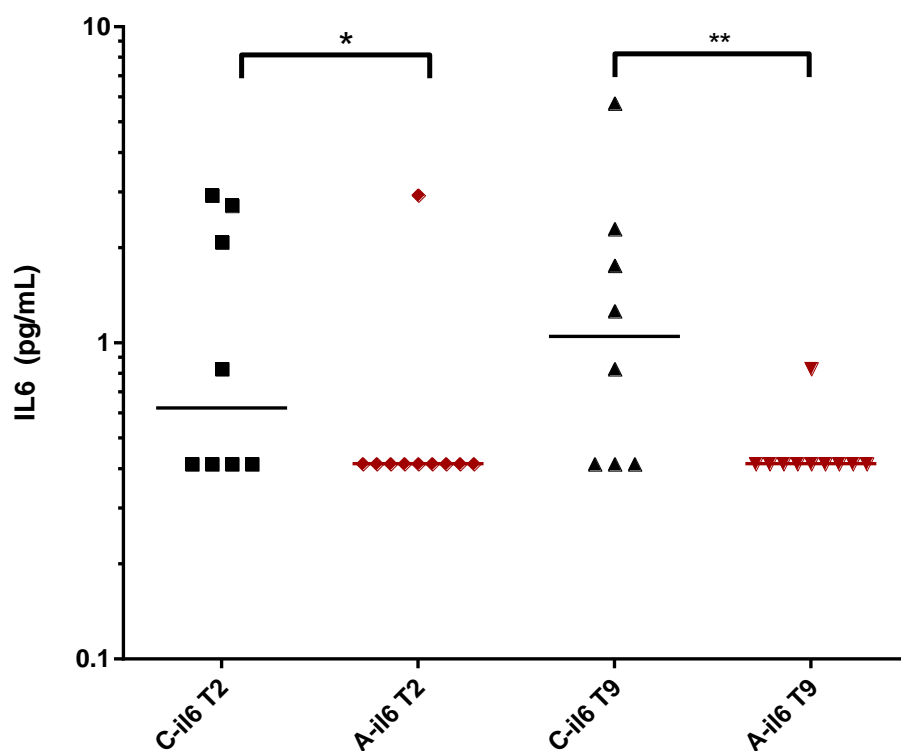


Figure n°28 : Distribution des valeurs d'IL-6 à AMH2 et à AMH+9 dans chacun des deux sous-groupes (C : Cyclée, A : Aménorrhée ; barre horizontale : médiane ; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

## 2. Comparaison multiple

Les concentrations d'IL-6 mesurées à AMH+3, AMH+6, AMH+9 ou AMH+12 ne sont **pas significativement différentes** des concentrations d'IL-6 mesurées à AMH2, que ce soit lorsque l'analyse de variance est réalisée dans la population globale ( $n = 12$ ), dans le groupe Cyclée ( $n = 8$ ) ou dans le groupe Aménorrhée ( $n = 4$ ). Les concentrations plasmatiques d'IL-6 n'évoluent donc **pas significativement** au cours de la **première année post-CT**.

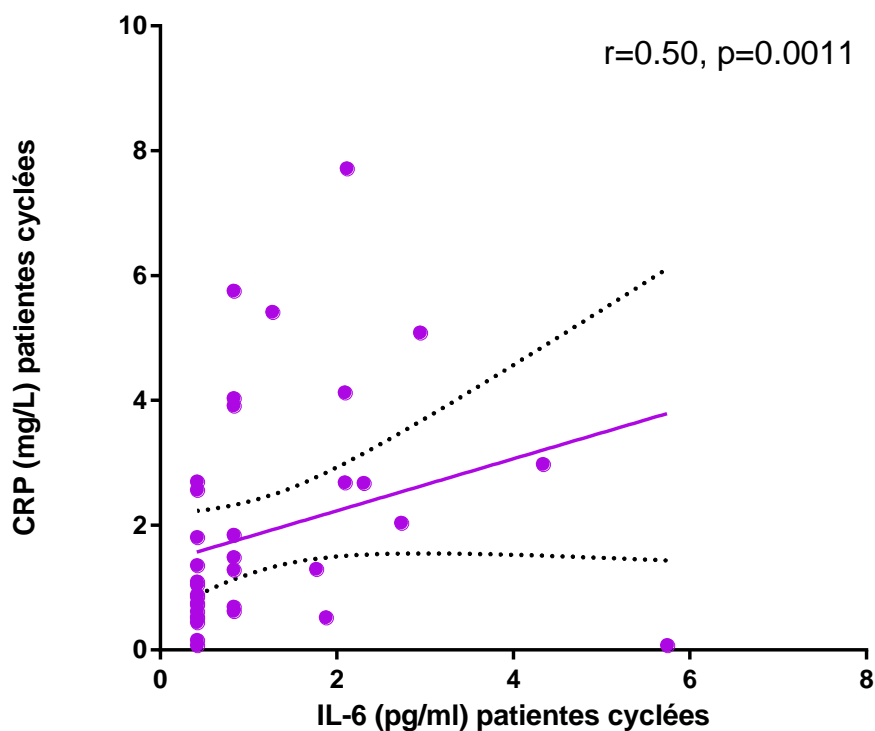
## 3. Corrélation IL-6 / CRPus

Une **corrélation positive** statistiquement significative (Test de Spearman,  $r = 0.5042$ ,  $p = 0.0011$ ) a été mise en évidence entre l'IL-6 et la CRPus chez les patientes du

groupe **Cyclée** (n = 39), lors de l'analyse des données de **tous les temps** (AMH2, AMH+3, AMH+6, AMH+9, AMH+12), (cf Figure n°29).

Lorsque le test de Spearman est réalisé chez les patientes du groupe **Aménorrhée** tous temps confondus (n = 45), nous ne retrouvons pas de corrélation entre l'IL-6 et la CRPus ( $r = - 0.1051$ ,  $p = 0.49$ ).

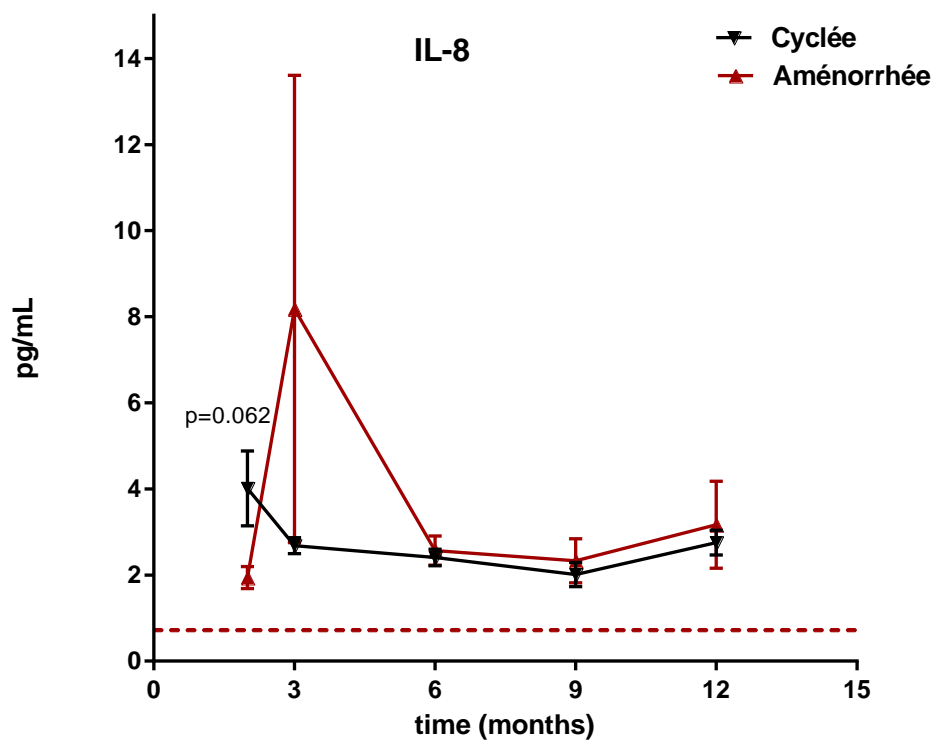
Une corrélation positive statistiquement significative existe aussi entre l'IL-6 et la CRPus en analysant l'effectif des **patientes des deux groupes** (Cyclée et Aménorrhée), tous temps confondus (n = 84), (Test de Spearman,  $r = 0.4092$ ,  $p = 0.0001$ ). Cependant, les valeurs d'**IL-6** des patientes du groupe **Aménorrhée** étant quasiment toutes identiques et inférieures à la LLOQ, cela pourrait biaiser notre analyse statistique.



*Figure n°29 : Droite de corrélation (trait plein) et intervalle de confiance (traits pointillés) entre l'IL-6 et la CRPus chez les patientes du groupe Cyclée, tous temps confondus.*

#### iv. Interleukine-8

Les valeurs d'IL-8 mesurées à **AMH2** tendent à être **plus élevées** dans le groupe **Cyclée** (n = 8) comparé au groupe Aménorrhée (n = 9), (**p = 0.0626**, Mann Whitney), (cf Figures n°30 et 31). Ensuite, les deux courbes se croisent entre AMH2 et AMH+3, puis se rejoignent entre AMH+3 et AMH+6 pour devenir superposables du temps AMH+6 au temps AMH+12. L'important écart-type observé à AMH+3 dans le groupe Aménorrhée est liée à une valeur d'IL-8 élevée (62.43 pg/ml) chez une patiente de ce groupe. Ce dosage a été vérifié au cours d'une autre série. La patiente avait mal toléré la CT (migraines et nausées) et présentait des effets secondaires liés au traitement (alopécie, douleurs articulaires, signes de carence oestrogénique).



*Figure n°30 : Profils évolutifs des concentrations plasmatiques d'IL-8 (moyenne  $\pm$  SEM ; LLOQ annoncée par le fournisseur).*

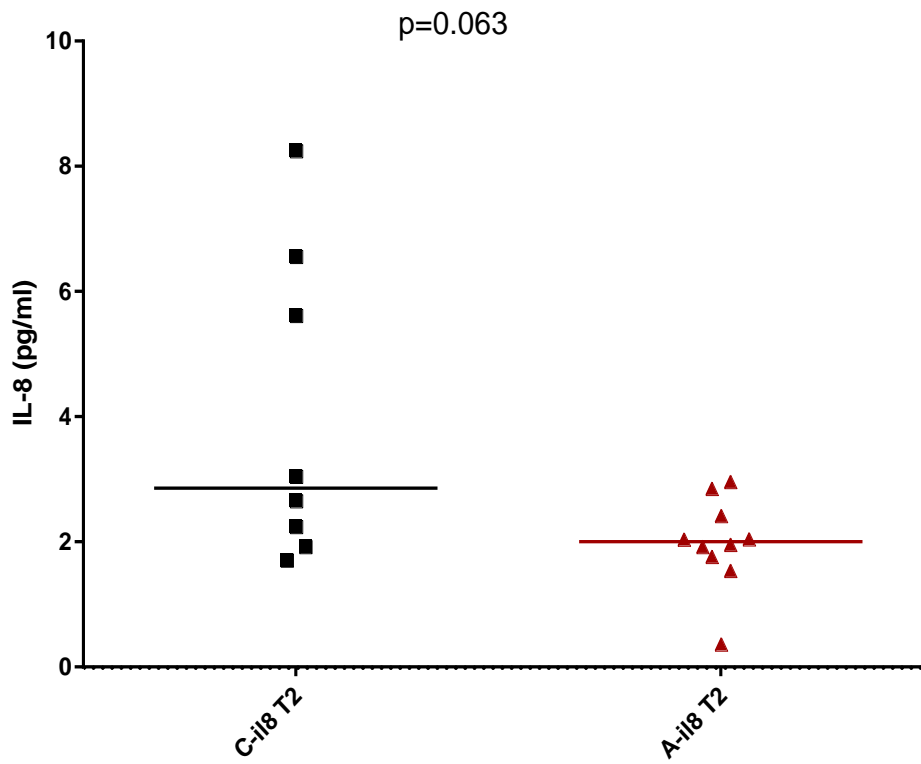


Figure n°31 : Distribution des valeurs d'IL-8 à AMH2 dans chacun des deux sous-groupes (C : Cyclée, A : Aménorrhée, barre horizontale : médiane).

## v. Interleukine-1 $\beta$

### 1. Comparaison inter-groupe

La comparaison inter-groupe des concentrations plasmatiques d'IL-1 $\beta$  ne montre **pas de différence** statistiquement significative à aucun des temps étudiés (cf Figure n°32).

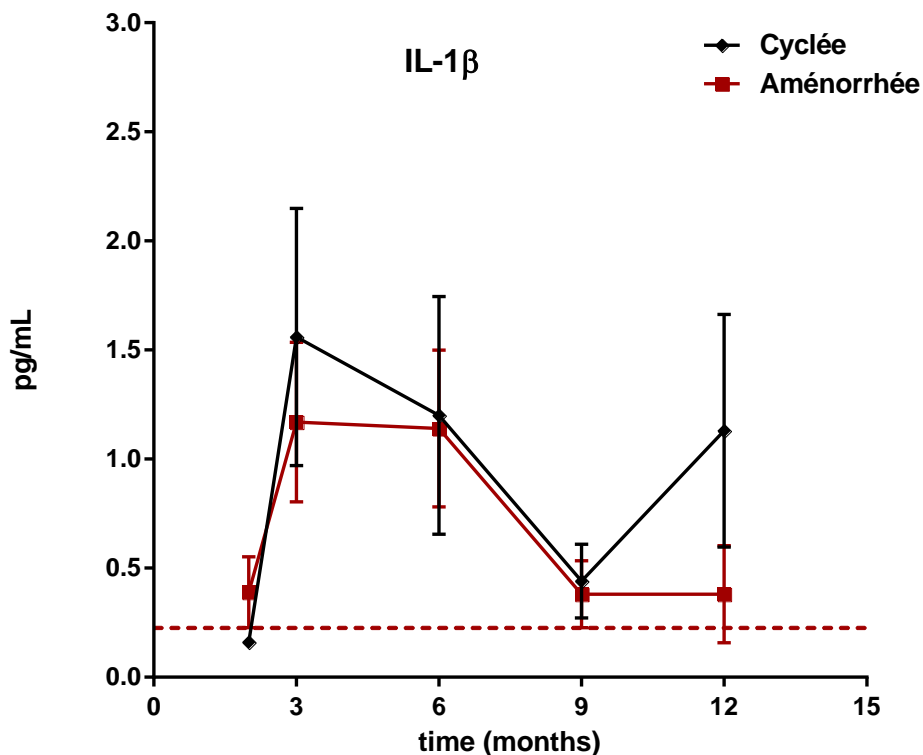


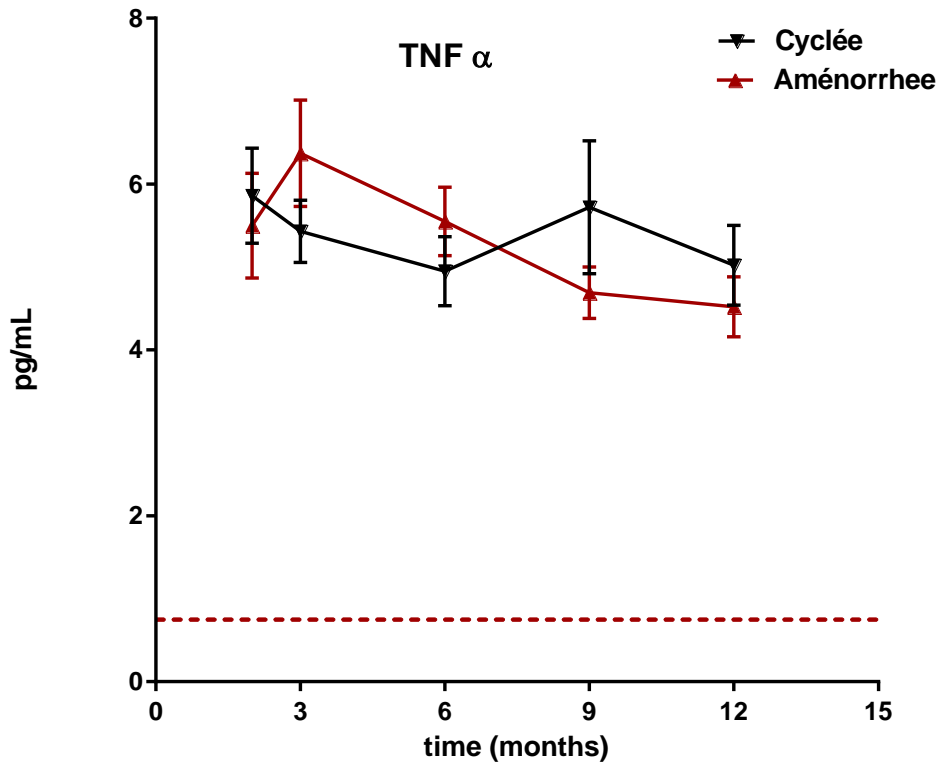
Figure n°32 : Profils évolutifs des concentrations plasmatiques d'IL-1 $\beta$  (moyenne  $\pm$  SEM ; LLOQ déterminée par le profil de précision).

### 2. Comparaison multiple

Par ailleurs, nous avons voulu comparer par analyse de variance les valeurs d'IL-1 $\beta$  au temps AMH2 avec chacun des autres temps dans l'effectif des patientes avec données complètes (n = 10). Les concentrations d'IL-1 $\beta$  mesurées à AMH+3, AMH+6, AMH+9 ou AMH+12 ne sont **pas** significativement **différentes** des concentrations d'IL-1 $\beta$  mesurées à AMH2.

vi. **TNF- $\alpha$**

La comparaison des valeurs de TNF- $\alpha$  entre les deux sous-groupes ne montre **pas de différence** statistiquement significative aux 5 temps étudiés (cf Figure n°33).



*Figure n°33 : Profils évolutifs des concentrations plasmatiques de TNF- $\alpha$  (moyenne  $\pm$  SEM ; LLOQ annoncée par le fournisseur).*



## vii. Interleukine-10

### 1. Comparaison inter-groupe

La comparaison des valeurs d'IL-10 entre les deux sous-groupes ne montre **pas de différence** statistiquement significative aux 5 temps étudiés (cf Figure n°34).

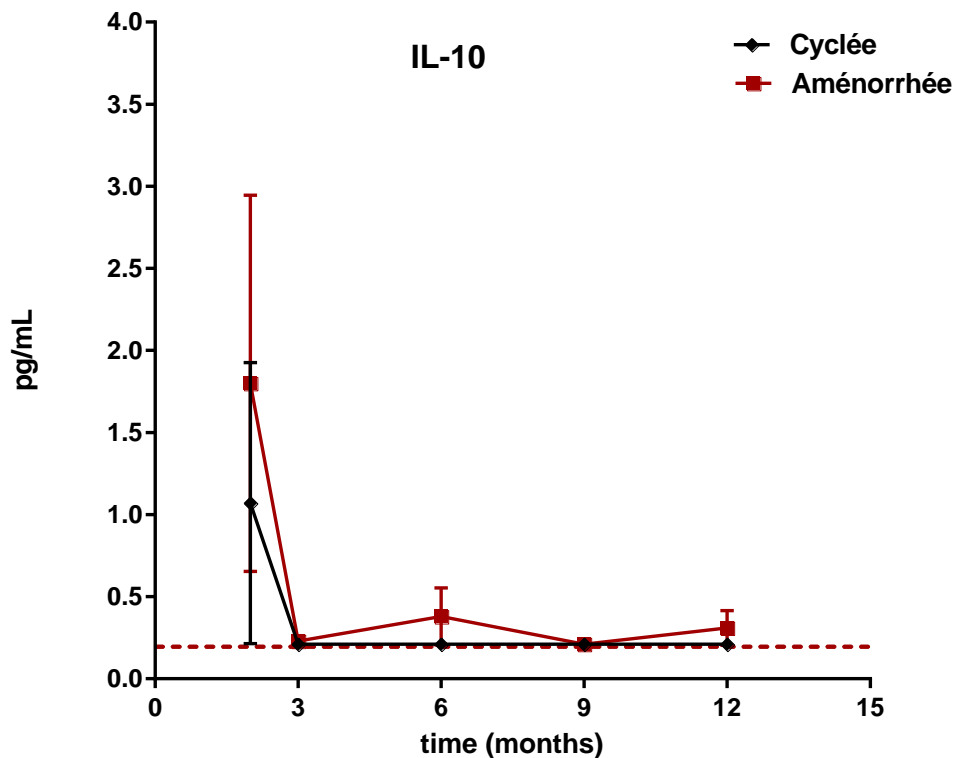


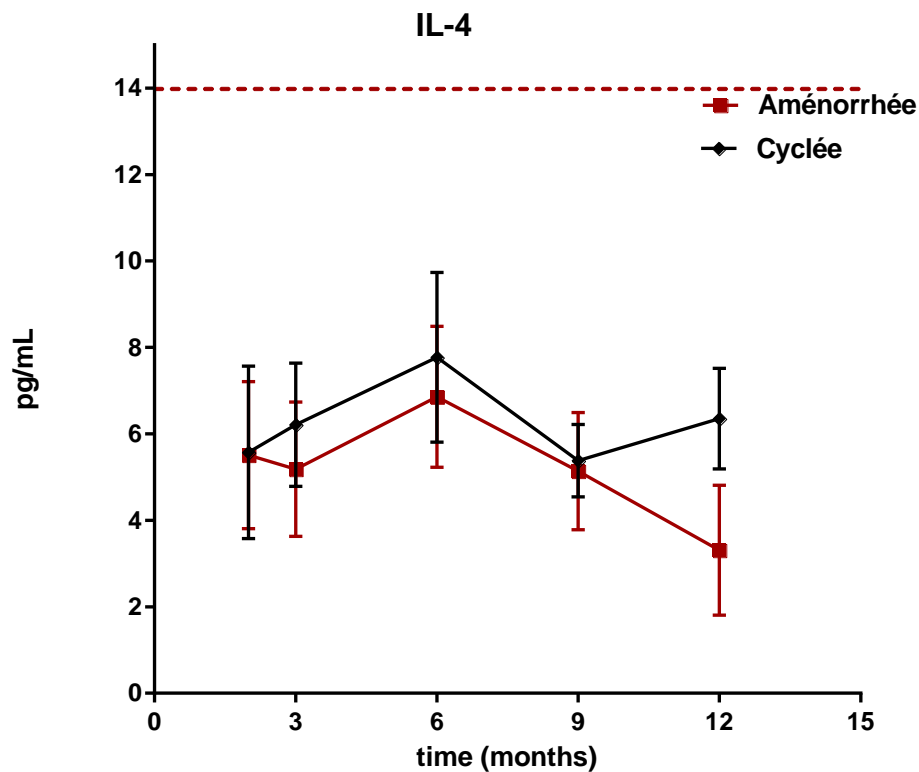
Figure n°34 : Profils évolutifs des concentrations plasmatiques d'IL-10 (moyenne  $\pm$  SEM ; LLOQ déterminée par le profil de précision).

### 2. Comparaison multiple

Par ailleurs, nous avons voulu comparer par analyse de variance les valeurs d'IL-10 au temps AMH2 avec chacun des autres temps dans l'effectif des patientes avec données complètes ( $n = 12$ ). Les concentrations d'IL-10 mesurées à AMH+3, AMH+6, AMH+9 ou AMH+12 ne sont **pas** significativement **différentes** des concentrations d'IL-10 mesurées à AMH2.

### viii. Interleukine-4

Les concentrations plasmatiques d'IL-4 des patientes du groupe Cyclée ne sont **pas** statistiquement **différentes** de celles des patientes du groupe Aménorrhée, cependant les valeurs mesurées sont inférieures à la limite de quantification que nous avons déterminée avec le profil de précision (cf Figure n°35).



*Figure n°35 : Profils évolutifs des concentrations plasmatiques d'IL-4 (moyenne  $\pm$  SEM ; LLOQ déterminée par le profil de précision).*

c. Paramètres nutritionnels

i. **BMI**

1. **Comparaison inter-groupe du BMI des patientes au temps AMH2**

Au temps **AMH2**, les patientes du groupe **Cyclée** (n = 7) présentent un BMI significativement **plus élevé** que les patientes du groupe **Aménorrhée** (n = 8), (médiane de **24.8** versus **21.2** kg/m<sup>2</sup>, **p = 0.0205**, Test de Mann Whitney ; cf Figure n°36). Le poids des patientes en fin de CT semble donc influencer la reprise des cycles menstruels en post-CT.

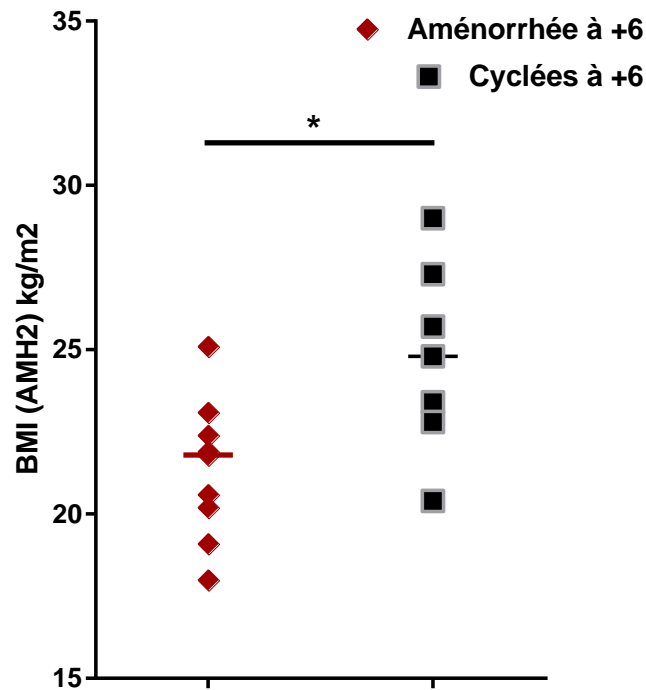


Figure n°36 : Comparaison inter-groupe du BMI des patientes au temps AMH2 (petite barre horizontale : médiane ; \* p < 0.05.)

2. **Corrélations entre le BMI et certains marqueurs nutritionnels ou inflammatoire au temps AMH2**

Nous avons recherché l'existence de corrélations entre le BMI et certains marqueurs nutritionnels ou inflammatoire au temps AMH2. L'analyse statistique a été effectuée à

l'aide d'un test de **Spearman** (test non paramétrique) chez les **patientes des deux groupes pour lesquelles nous disposons des données** des paramètres à corrélérer au temps **AMH2**.

- Corrélation BMI - SBP

Nous avons recherché une liaison entre le BMI et la SBP au temps **AMH2** dans la cohorte globale avec un test de Spearman. L'analyse n'a **pas** montré **de corrélation** entre ces deux paramètres au temps AMH2 ( $r = -0.19$  ;  $p = 0.51$  ;  $n = 13$ ).

- Corrélation BMI – leptine

Nous avons recherché une liaison entre le BMI et la leptine au temps **AMH2** dans la cohorte globale avec un test de Spearman. L'analyse n'a **pas** montré **de corrélation** entre ces deux paramètres au temps AMH2 ( $r = 0.24$  ;  $p = 0.42$  ;  $n = 13$ ).

- Corrélation BMI – CRPus

Nous avons recherché une liaison entre le BMI et la CRPus au temps **AMH2** dans la cohorte globale avec un test de Spearman. L'analyse n'a **pas** montré **de corrélation** entre ces deux paramètres au temps AMH2 ( $r = 0.29$  ;  $p = 0.33$  ;  $n = 13$ ).

## ii. SBP

### 1. Comparaison inter-groupe

La SBP semble plus élevée à tous les temps chez les patientes du groupe Aménorrhée. Les comparaisons inter-groupes tendent vers la significativité au temps **AMH2** (Cyclée :  $n = 8$  ; Aménorrhée :  $n = 9$  ;  $p = 0.079$ ) et au temps **AMH+9** (Cyclée :  $n = 8$ , Aménorrhée :  $n = 10$  ;  $p = 0.0999$ ), (cf Figures n°37 et 38).

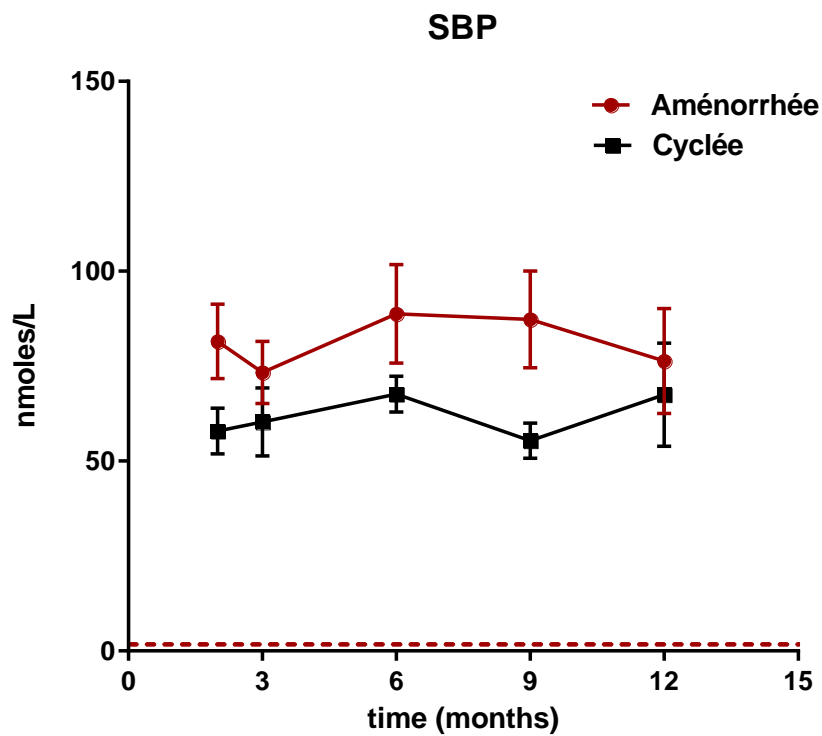


Figure n°37 : Profils évolutifs des concentrations sériques de SBP (moyenne  $\pm$  SEM ; LLOQ).

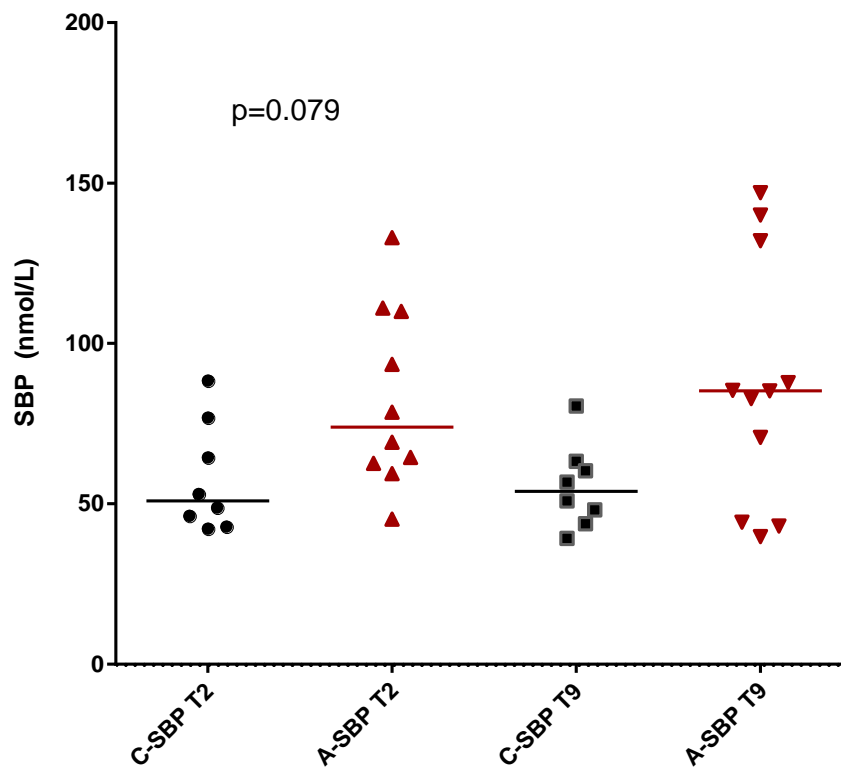


Figure n°38 : Distribution des valeurs de SBP dans chacun des deux sous-groupes à AMH2 et à AMH+9 (C : Cyclée ; A : Aménorrhée ; barre horizontale : médiane).

## 2. Corrélation SBP – leptine au temps AMH2

Nous avons recherché une liaison entre la SBP et la leptine au temps **AMH2** dans la cohorte globale avec un test de Spearman. L'analyse statistique n'a **pas** montré de **corrélation** entre ces deux paramètres au temps AMH2 ( $r = 0.13$  ;  $p = 0.67$  ;  $n = 17$ ).

### iii. Leptine

Bien que les concentrations de leptine semblent plus élevées dans le groupe Cyclée, la comparaison par test de Mann Whitney ne montre **pas de différence** statistiquement significative entre les deux sous-groupes en particulier au temps **AMH2** (Cyclée :  $n = 8$  ; Aménorrhée :  $n = 9$ ), (cf Figure n°39). Le **BMI** des patientes apparaît comme un facteur influençant la reprise des cycles menstruels, néanmoins cette dissemblance entre les deux groupes ne serait **pas** liée à une différence de la **composition corporelle en tissu adipeux**.

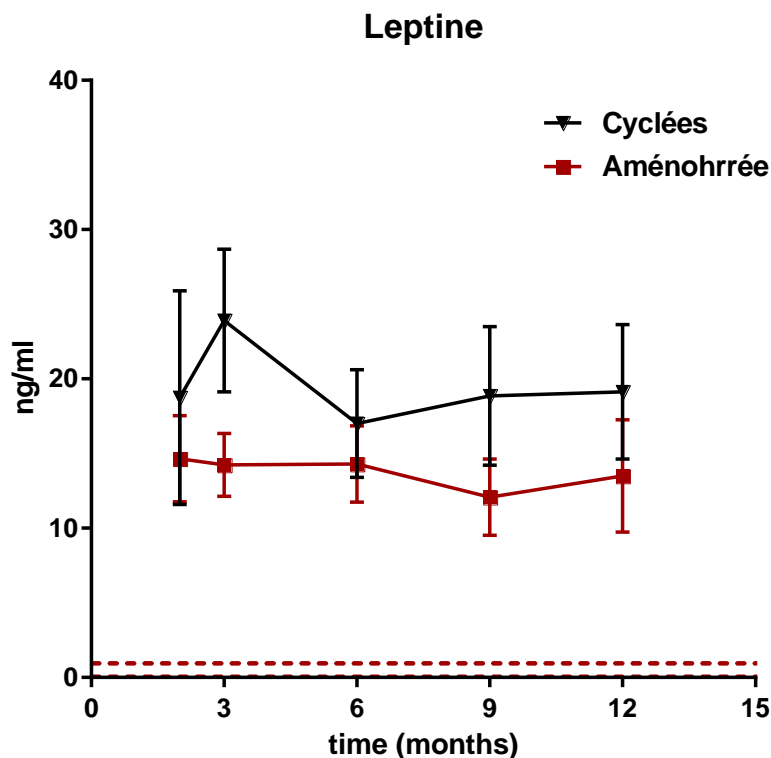


Figure n°39 : Profils évolutifs des concentrations sériques de leptine (moyenne  $\pm$  SEM ; LLOQ).

# **Discussion**

## **1. Influence du statut inflammatoire sur la récupération de la fonction ovarienne précoce post-chimiothérapie**

### a. Interprétation de nos résultats par rapport aux données de la littérature

Aux temps AMH2 et AMH+9, les patientes du groupe Cyclée ont un profil de concentrations d'**IL-6** significativement plus élevées que les patientes du groupe Aménorrhée. Cependant, les concentrations d'IL-6 mesurées chez les patientes du groupe Aménorrhée se situent en-dessous de la LLOQ déterminée par le profil de précision, ce qui limite la puissance de l'analyse statistique. Au temps AMH2, les concentrations d'**IL-8** tendent également à être plus élevées dans le groupe Cyclée. Notre étude suggère donc une expression plus importante de cytokines dites « pro-inflammatoires » à certains temps chez les patientes du groupe Cyclée.

Ces données sont intéressantes car le rôle de l'**IL-6**, l'**IL-8** et l'**IL-10** dans la récupération de la fonction ovarienne post-CT a été illustré dans un modèle murin d'IOP chimio-induite (21). Ces interleukines font partie des 23 **cytokines majeures** sécrétées par les cellules épithéliales amniotiques humaines, qui pourraient contribuer à **restaurer le microenvironnement ovarien**, notamment en inhibant l'apoptose des CG et en favorisant l'angiogenèse.

Nous avons voulu **comparer** les concentrations de **cytokines** mesurées chez nos patientes à celles déterminées dans **d'autres études** ayant utilisé des techniques de dosage similaires à la nôtre.

Sahdo et al (60) ont étudié la relation entre les polymorphismes génétiques de l'inflammasome et les profils plasmatiques cytokiniques dans une grande **cohorte de donneurs de sang** suédois en bonne santé [1006 donneurs de sang, dont 63 % d'hommes et 37 % de femmes, d'âge moyen 42 ans (intervalle 19-67 ans)]. L'inflammasome est l'un des composants clés de l'immunité innée et son activation conduit à la libération de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 $\beta$ . Un kit d'**IL-1 $\beta$**  hyper-sensible et un kit multiplex (**IL-6, IL-8, TNF** et IL-1Ra, fournisseur MILLIPORE) ont été utilisés sur le **Luminex 200** pour mesurer les concentrations **plasmatiques** de cytokines chez des sujets porteurs de polymorphismes de l'inflammasome et chez des sujets non porteurs (**cas contrôles**).

Chez les cas **contrôles**, la médiane des concentrations d'**IL-6** (1.03 pg/ml) était proche de la médiane des patientes du groupe **Cyclée** de notre étude au temps **AMH9** (1.05 pg/ml), contrairement aux patientes du groupe Aménorrhée (médiane 0.42 pg/ml à AMH9).

La médiane des concentrations d'**IL-8** chez les cas contrôles (5.05 pg/ml) de cette étude semble **un peu plus élevée** que la médiane des patientes de **notre étude** que ce soit celles du groupe Cyclée (médiane comprise entre 2.06 et 2.86 pg/ml) et ou celles du groupe Aménorrhée (médiane comprise entre 1.79 et 3.08 pg/ml) aux différents temps étudiés.

Les concentrations de **TNF** du groupe contrôle (médiane : 4.69 pg/ml) semblent **comparables** à celles retrouvées chez les patientes du groupe **Cyclée** (médiane comprise entre 4.99 et 5.95 pg/ml) et chez les patientes du groupe **Aménorrhée** (médiane comprise entre 4.33 et 6.09 pg/ml) aux différents temps étudiés.

Par ailleurs, la médiane des concentrations d'**IL-1 $\beta$**  chez les cas contrôles (9.02 pg/ml) semble **plus élevée** que la médiane des patientes du groupe **Cyclée** (médiane comprise entre 0.16 et 0.80 pg/ml) et du groupe **Aménorrhée** (médiane comprise entre 0.16 et 1.13 pg/ml) aux différents temps étudiés.



Une seconde étude américaine (61) a comparé le profil de **cytokines sériques** chez des patients obèses versus des **patients minces**, dont l'**IL-6**. Le groupe **contrôle** (n = 37) était constitué de 84 % de femmes, d'âge moyen 42.3 ans et ayant en moyenne un BMI de 22.4 kg/m<sup>2</sup>. Chez ces patients minces, la majorité des valeurs d'IL-6 étaient comprises entre **0.047 pg/ml et 1.0 pg/ml**. Chez les patients obèses, les concentrations d'IL-6 étaient statistiquement plus élevées que chez les patients minces, et s'échelonnaient entre 0.078 pg/ml et 2.14 pg/ml. Dans notre étude, les concentrations d'IL-6 étaient comprises entre des valeurs inférieures à la LLOQ (0.83 pg/ml) et 5.739 pg/ml chez les patientes du groupe Cyclée, ou 2.62 pg/ml chez les patientes du groupe Aménorrhée (médiane des échantillons à **0.42 pg/ml** dans les deux groupes, tous temps confondus).

Enfin, Sun et al (62) ont comparé les **niveaux sériques d'IL-6** entre un groupe de patientes présentant une **IOP d'origine auto-immune**, et un groupe de femmes avec une fonction ovarienne normale appariées sur l'âge (âge moyen : 29 ans, BMI moyen : 20.3 versus 20.2 kg/m<sup>2</sup>). On remarque que chez les femmes du groupe **contrôle** (n = 40), les concentrations sériques d'IL-6 (moyenne +/- ET : **1.61 +/- 0.75 pg/ml**) sont proches de celles mesurées chez nos patientes du groupe **Cyclée** aux temps **AMH2** (moyenne +/- ET : **1.28 +/- 1.11 pg/ml**), **AMH9** (moyenne +/- ET : **1.64 +/- 1.79 pg/ml**) et **AMH12** (moyenne +/- ET : **1.19 +/- 1.36 pg/ml**). Alors que chez les patientes du groupe **Aménorrhée**, la moyenne des concentrations d'IL-6 est de **0.42 pg/ml** à tous les temps. Dans cette étude, les patientes présentant une **IOP d'origine auto-immune**, ont des concentrations d'IL-6 significativement **plus élevées** que les femmes du groupe contrôle (moyenne +/- ET : **16.28 +/- 4.31 pg/ml**). Néanmoins, des réserves peuvent être émises quant à la méthode de dosage de l'IL-6 utilisée dans cette étude (kit ELISA, Shanghai Xinfan Biotechnology).

Nous avons donc observé globalement des concentrations plasmatiques d'**IL-6 et d'IL-8 plus élevées** chez les patientes du groupe **Cyclée** comparé aux patientes du groupe

Aménorrhée. Pour autant, chez les patientes du groupe **Cyclée**, les concentrations d'**IL-6** sont **plus basses que chez des individus possédant un statut inflammatoire** (polymorphismes génétiques de l'inflammasome, obésité, IOP auto-immune). En fait, nous observons chez ces patientes Cyclées des **valeurs proches** de celles de sujets **contrôles** dans la littérature. Finalement, ces observations nous amènent à penser que les patientes du groupe **Aménorrhée** présentent des concentrations de **cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8) plus basses** que celles observées **physiologiquement**.

La **CRPus** est une protéine synthétisée dans le foie sous l'influence de différentes cytokines, en particulier l'**IL-6**. Nos résultats montrent une **corrélation positive** statistiquement significative entre l'**IL-6** et la **CRPus** chez les patientes du groupe **Cyclée**, lorsque nous analysons les données de tous les temps, confirmant le lien entre ces deux paramètres.

Nous avons recherché si l'existence d'une **inflammation de bas grade** (Low Grade Inflammation : **LGI**), définie par une valeur de **CRPus** comprise entre **3 et 6 mg/l**, pouvait influencer le profil de récupération ovarienne post-CT. Pour définir la **LGI**, nous nous sommes basés sur une étude danoise (33) ayant évalué la relation entre la **LGI** et la qualité de vie liée à la santé dans une grande **cohorte de donneurs de sang** (n = 17 024). La **LGI** était définie par une **CRPus** comprise entre 3.0 et 10.0 mg/l. La **CRPus** était mesurée dans le plasma à l'aide d'un système automatisé (Ortho Vitros 5600, Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY, USA). La cohorte comprenait 47.3% de femmes, d'âge médian 37.8 ans, et ayant un **BMI** médian de 23.5 kg/m<sup>2</sup>. Chez ces **femmes**, la valeur médiane de la **CRPus** plasmatique était de **0.67 mg/l**, et la prévalence de la **LGI** était estimée à **14.6% des femmes**.

Dans notre étude, 6 échantillons du groupe Cyclée et 3 échantillons du groupe Aménorrhée classaient les patientes en **LGI**. Seulement un échantillon de chaque groupe correspondait à une **inflammation patente** (CRPus > 6 mg/l). La médiane des concentrations de CRPus de tous les échantillons, tous temps confondus, était supérieure chez les patientes du groupe **Cyclée** (1.1 versus 0.7 mg/l,  $p = 0.0061$ ). Il est à noter qu'au temps AMH+6, la CRPus tendait à être plus élevée dans le groupe **Cyclée** (moyenne +/- ET : 2.61 +/- 2.87 mg/l versus 0.65 +/- 0.47 mg/l,  $p = 0.09$ ).

A notre connaissance, aucune étude n'a évalué la relation entre la LGI et la récupération de la fonction ovarienne post-CT.

Contrairement à une autre étude réalisée aux EU chez des femmes en âge de procréer (63), nous n'avons **pas** mis en évidence de **corrélation** entre la **CRPus** et le **BMI** au temps **AMH2**. Sjaarda *et al* ont trouvé que le BMI et le tour de taille étaient associés positivement et de manière indépendante avec une élévation modérée de la CRPus (2.0 à 9.99 mg/l). Cependant, l'étude incluait trois cohortes distinctes de femmes âgées de 18 à 44 ans, et ayant un BMI moyen de 24.1 à 28.1 kg/m<sup>2</sup>. Les dosages de CRPus étaient réalisés avec des techniques différentes selon les cohortes (immunodosage chimiluminescent sur Immulite / dosage immunoturbidimétrique sur Cobas, ROCHE / dosage néphélométrique sur BN II).

Par ailleurs, nous avons évalué les concentrations sériques d'un autre **marqueur biologique de l'inflammation**, à savoir l' **$\alpha$ 1-AT**. Les profils des concentrations d' $\alpha$ 1-AT entre les patientes du groupe Cyclée et les patientes du groupe Aménorrhée ne montraient pas de différence statistiquement significative. Des auteurs ont cependant suggéré que des taux plus élevés d' $\alpha$ 1-AT dans le liquide folliculaire de femmes suivant une COS

pourraient inhiber la maturation ovocytaire, conduisant à des taux de fécondation plus faibles chez ces patientes (64).

b. Implications physio-pathologiques

Au temps **AMH2**, nos résultats montrent des concentrations plasmatiques d'**IL-6** significativement **plus élevées** chez les patientes du groupe **Cyclée**, soit **avant la reprise des cycles menstruels** à AMH+6. De même, les concentrations d'**IL-8** tendaient à être plus élevées chez les patientes du groupe **Cyclée** à **AMH2**. Ceci identifie un **rôle** potentiellement **activateur** de l'**IL-6** et de l'**IL-8** sur la voie de signalisation **PI3K/Akt**, qui comme nous l'avons vu, joue un rôle clé dans la régulation de la quiescence des follicules primordiaux.

Plus tardivement à **AMH+9**, nous avons également observé chez les patientes du groupe **Cyclée** une **élévation** des concentrations circulantes d'**IL-6**, **postérieure à la reprise des cycles** (AMH+6). Cette observation pourrait être le **témoin de la reprise de l'ovulation**. En effet, de nombreux auteurs ont comparé l'ovulation à une **réaction inflammatoire** (65). Dans les 36 heures suivant le pic de LH, des modifications structurelles et fonctionnelles ont lieu au sein du follicule pré-ovulatoire pour permettre la rupture folliculaire et la libération de l'ovocyte. Des **cytokines** et des **chémokines** sont sécrétées par les **CG** et les **leucocytes résidents**. La thèque interne et la couche de CG, auparavant avasculaires, sont envahies par un réseau de capillaires sanguins, permettant le recrutement de **leucocytes circulants**, qui participent aux processus inflammatoires associés à l'ovulation. Des cytokines comme l'**IL-1** ou l'**IL-6**, pourraient contribuer à l'infiltration leucocytaire en améliorant la perméabilité des petits vaisseaux, ou en augmentant l'expression de molécules d'adhésion cellulaire sur les cellules endothéliales, tandis que les chémokines agissent comme chémo-attractants pour les leucocytes.

On peut se demander si le profil des concentrations de cytokines mis en évidence au niveau plasmatique reflète celui du liquide folliculaire. Dans une étude anglaise (66), une augmentation des concentrations d'**IL-6** et d'**IL-8** a été mise en évidence dans le **liquide folliculaire en phase pré-ovulatoire**. Les auteurs ont étudié les concentrations de cytokines dans le liquide folliculaire et le plasma de **10 femmes** qui suivaient une **FIV** ou une **ICSI** (IntraCytoplasmic Sperm Injection) pour une infertilité d'origine masculine ou idiopathique. Les patientes étaient âgées de 30.8 ans en moyenne et leur BMI moyen était de 23.5 kg/m<sup>2</sup>. Des aspirations de liquide folliculaire ont été réalisées par ponction folliculaire écho-guidée chez ces femmes lors d'un **cycle naturel** (soit en milieu de phase folliculaire, soit en phase ovulatoire quelques heures après le pic de LH), et lors d'un **cycle de traitement** (36 heures après le pic de LH endogène ou exogène), et de manière concomitante à la ponction ont été prélevés des échantillons sanguins. La méthodologie de dosage utilisait un kit multiplex Bio-Rad sur le Luminex 100. Les auteurs ont observé que les concentrations d'**IL-6** et d'**IL-8** dans le **liquide folliculaire** étaient significativement **plus élevées en phase pré-ovulatoire** du cycle naturel ou de traitement comparé à celles en milieu de phase folliculaire du cycle naturel. Cependant, **aucune différence** notable du taux de ces cytokines n'a été identifiée dans le **plasma** de ces patientes, prélevé juste avant la ponction folliculaire. Les limites de cette étude sont la petite taille de la cohorte, et l'inégalité des effectifs entre les différents sous-groupes.

Capobianco et al (67) ont comparés les taux plasmatiques de **CRP** et de **leptine** à différentes phases du cycle menstruel entre des femmes présentant des **cycles ovulatoires** et des **femmes n'ovulant pas**. Le caractère ovulatoire d'un cycle était défini par une concentration sérique en progestérone  $\geq 10$  ng/ml. La CRP a été évaluée par un immunodosage enzymatique de type sandwich (Immundiagnostik AG, Bensheim) de même que la leptine (DRG instruments GmbH, Marburg). Dix-huit femmes âgées de 21 à 44 ans

ont été incluses, avec un BMI compris entre 18.4 et 25.4 kg/m<sup>2</sup>. Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence des taux plasmatiques de **CRP** et de **leptine** significativement **plus élevés** à la **phase péri-ovulatoire des cycles ovulatoires** comparé à la phase péri-ovulatoire des cycles anovulatoires. Par ailleurs, au cours d'un même cycle, qu'il soit ovulatoire ou non, les concentrations de CRP et de leptine ne variaient pas significativement.

## **2. Influence du statut nutritionnel sur la récupération de la fonction ovarienne précoce post-chimiothérapie**

Dans notre étude, nous avons montré que les patientes ayant récupéré leurs **cycles menstruels à 6 mois post-CT**, présentaient au diagnostic (**AMH0**) et en fin de CT (**AMH2**) un **BMI plus élevé** que les patientes du groupe Aménorrhée. Le **poids** semble donc influencer la **folliculogenèse ovarienne** mais cette différence n'est **pas liée à la masse grasse**. En effet, la comparaison intergroupe des concentrations sériques de leptine n'était pas statistiquement significative aux différents temps étudiés.

Nos données confirment celles d'une étude américaine (68) et d'une étude française (69), qui ont cherché à identifier des **facteurs prédictifs de la récupération ovarienne post-CT**.

Su *et al* (68) se sont intéressés à des **facteurs cliniques et biologiques évalués en pré-CT**. La cohorte était constituée de jeunes patientes (n = 109) recevant un traitement par **CT** pour un **cancer du sein**. Les patientes étaient cependant plus âgées que dans notre étude (âge médian : 39.5 ans). Le BMI moyen au diagnostic était de **24.6 kg/m<sup>2</sup>**. Bien que le protocole de CT administré fût variable, il était basé sur le cyclophosphamide dans 83 %

des cas et plus de la moitié des patientes recevaient une anthracycline (doxorubicine) associé à un taxane (paclitaxel) et au cyclophosphamide. Cinquante-sept pourcents des patientes ont rapporté un retour des menstruations après une médiane de suivi de 5.4 mois. Un **BMI pré-CT  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>** apparaissait associé à un **retour plus rapide des menstruations** ( $p < 0.001$ ) lors de l'analyse statistique multivariée. Un **score pronostic** a été créé pour estimer le délai jusqu'au retour de la fonction ovarienne après CT. Ce score incluait **trois paramètres évalués avant la CT** : l'âge de moins de 40 ans, une concentration sérique d'AMH  $> 5$  pmol/l et un BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> (1 point par item). Les concentrations d'AMH ont été mesurées à l'aide d'un kit de dosage immuno-enzymatique (AMH Gen II assay, Beckman Coulter).

Dans une cohorte de 1210 patientes, Pistilli *et al* (69), ont déterminé par analyse de régression multivariée les **facteurs prédisant le retour des menstruations dans les 18 mois post-CT**. Parmi ceux-ci figure le **BMI évalué après CT**. La cohorte a été sélectionnée à partir des essais cliniques PACS04 et PACS05 (Programme Adjuvant dans le Cancer du Sein, R & D UNICANCER). Après un suivi médian de 90 mois, seulement 28% des femmes incluses avaient retrouvé leurs cycles menstruels, probablement en raison du critère d'inclusion de l'âge des patientes ( $\leq 50$  ans).

Néanmoins, l'influence du BMI sur la récupération de la fonction ovarienne après CT pour un cancer du sein n'a pas été observée dans toutes les populations. Kim *et al* ont évalué des **marqueurs clinico-biologiques** (âge, BMI, type de protocole de CT, concentrations sanguines d'AMH, d'œstradiol et d'inhibine B) comme **prédicteurs de la récupération de la fonction ovarienne** chez des patientes coréennes atteintes d'un **cancer du sein** (70). Les patientes étaient issues de l'essai clinique ASTRRA, et la première évaluation de la fonction ovarienne avait été réalisée dans les 3 mois après le dernier cycle de CT. Dans cette étude, un **BMI plus élevé ( $> 27$  kg/m<sup>2</sup>)** n'était **pas associé** de manière

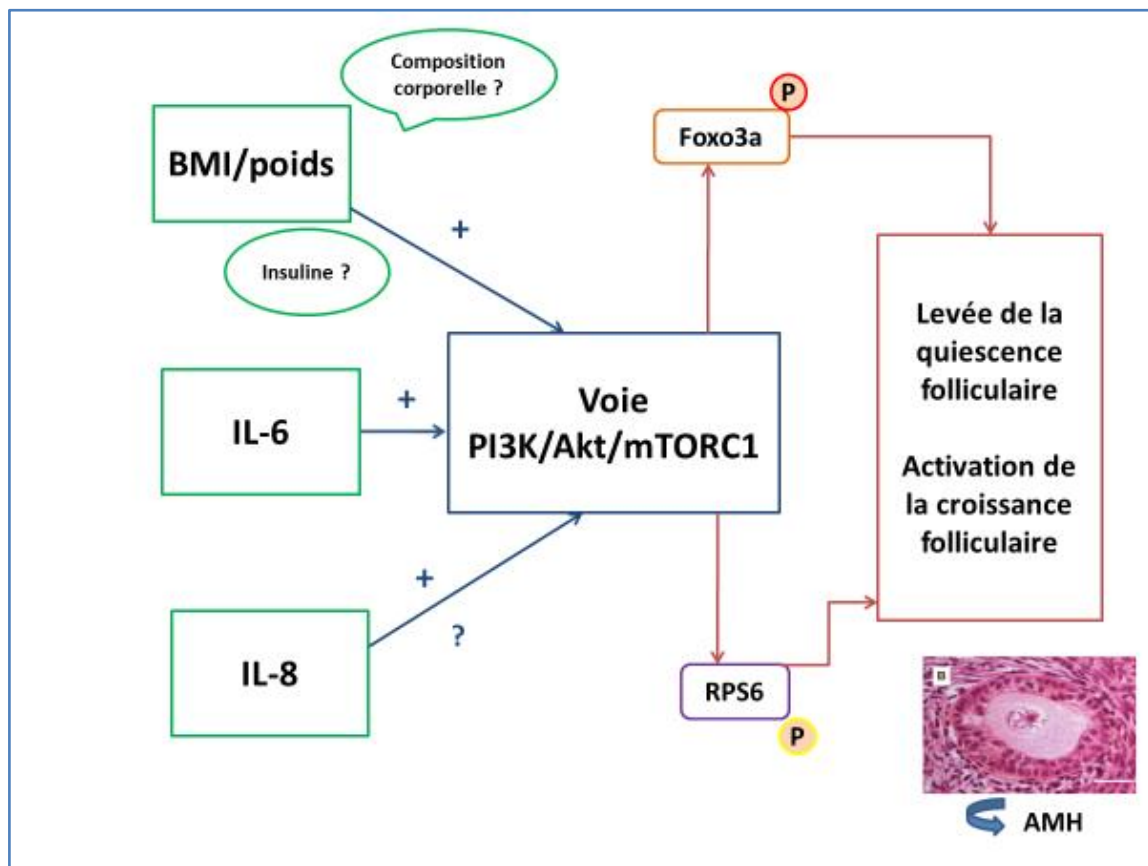
significative à un retour plus rapide des menstruations (12.6 mois en moyenne versus 22 mois ;  $p = 0.104$ ). La taille de la cohorte était relativement importante ( $n = 82$ ) mais l'âge moyen des patientes était plus élevé que dans notre étude (40.8 ans). Le statut des récepteurs hormonaux était positif chez toutes les patientes, et la tumeur était parfois à un stade avancé (stades I à III). Trois protocoles de CT adjuvante différents avaient été administrés, comprenant une anthracycline (doxorubicine), associée à du cyclophosphamide et/ou du docetaxel (Taxotere). Les patientes recevaient du tamoxifène, seul ou en association à un agoniste du GnRH comme thérapie endocrine adjuvante. La période de suivi médiane était d'environ 5 ans. Quarante-quatre patientes avaient retrouvé des menstruations dans les deux années suivant l'inclusion.

Nous n'avons pas pu étudier l'**évolution du BMI** au cours des **autres temps** clés du suivi à cause de l'**absence de données disponibles** pour la plupart des patientes. Il serait intéressant de **suivre le poids des patientes en post-CT** lors des visites médicales programmées à l'Observatoire de la Fertilité. En effet, des études ont montré que les patientes pouvaient regagner du poids longtemps après le diagnostic (71). Ce suivi permettrait de savoir si un **gain de poids** est observé **plus tardivement**, en particulier chez les patientes du groupe **Aménorrhée**. Min *et al* ont étudié les changements de poids et leurs facteurs associés au court terme (12 mois) et au long terme (5 ans), chez des patientes coréennes survivantes d'un **cancer du sein**. Les auteurs ont sélectionné des patientes ayant un BMI normal au moment du diagnostic. Parmi leur grande cohorte, 312 patientes étaient âgées de moins de 40 ans. Dans ce sous-groupe, une **perte** significative de **poids** était observée à **12 mois**, tandis qu'un **gain** significatif de poids était observé à **36, 48 et 60 mois**. A court terme, la perte de poids était associée au traitement par CT. Cependant, dans cette étude, les changements de poids n'ont **pas été comparés au statut menstruel** des



patientes. Par ailleurs, toutes les patientes n'avaient pas reçu de CT, le type de drogue n'a pas été renseigné, et certaines patientes avaient été traitées par radiothérapie.

Une étude américaine (72) a évalué l'état nutritionnel de patientes ayant été traitées pour un **cancer du sein** à un stade précoce, à travers la mesure de la **composition corporelle** totale et régionale en **masse grasse** et en **masse maigre**. Ces mesures ont été réalisées par absorptiométrie biphotonique à rayons X. Dans cette étude, les différents protocoles de CT adjuvante incluaient du cyclophosphamide, de la doxorubicine, du methotrexate, du fluorouracile et du paclitaxel. Les patientes étaient classées selon leur **statut menstruel 12 mois après le début** de la CT en deux groupes : IOP versus absence d'IOP. Quel que soit le sous-groupe, les patientes gagnaient du poids (+ 2.6 kg / + 2.9 kg). Cependant, on observait une **perte** significative de la **masse maigre du tronc** chez les patientes avec **IOP** (- 0.6 kg) comparé aux patientes sans IOP (+ 0.2 kg), ( $p = 0.003$ ). La tendance à perdre de la masse maigre totale était corrélée à une **diminution de la densité minérale osseuse** mesurée au niveau du col fémoral.



*Figure n°40 : Facteurs nutritionnels et inflammatoires supposés influencer la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR et leurs conséquences potentielles sur la régulation de la folliculogénèse ovarienne humaine précoce.*

[Section histologique d'une pièce de cortex ovarien montrant un follicule secondaire sain intact. D'après Telfer EE *et al*, Human Reproduction, 2008, (5)].

### 3. Perspectives

En conclusion, nos données préliminaires sur l'influence du **BMI** sur la **récupération ovarienne post-CT** ainsi que les informations recueillies dans la littérature, nous amènent à proposer un **suivi plus prolongé du poids des patientes en post-CT**. En outre, une **évaluation** plus poussée de la **composition corporelle** totale et régionale permettrait de préciser le rôle des compartiments de **masse maigre** et de **masse grasse**.

Par ailleurs, nous avons recueilli les données de **BMI** au temps **AMH2** chez les patientes incluses dans notre étude, c'est-à-dire celles pour lesquelles nous disposions d'échantillons de sérothèque et de plasmathèque. Il serait intéressant de tenter de recueillir le BMI au temps AMH2 chez les **autres patientes de l'étude préliminaire** qui n'ont pas pu faire partie de notre travail à cause de l'absence de prélèvements disponibles. Ceci permettrait de confirmer nos résultats sur le BMI dans une **plus grande cohorte**.

Comme nous l'avons évoqué dans la partie Introduction de ce travail, l'**insuline** est un facteur de croissance qui **active la voie de signalisation PI3K/Akt** et entraîne ainsi la **levée de la quiescence des follicules primordiaux**. C'est pourquoi, nous avons effectué des dosages plasmatiques d'insuline chez les **premières patientes incluses** dans cette étude. L'hétérogénéité de l'horaire du prélèvement (à jeûn ou en post-prandial) représentait un biais pour l'interprétation des résultats et nous a donc contraint à exclure ce paramètre. Il serait ainsi intéressant de poursuivre ce travail en répétant les dosages d'**insuline**, mais cette fois-ci chez des **patientes prélevées de manière homogène** à jeûn, afin de mettre en évidence *in vivo* le rôle activateur de l'insuline sur la folliculogénèse ovarienne humaine précoce.

Enfin, il serait souhaitable de doser la **pico-AMH** chez les **4 patientes** du groupe **Aménorrhée** incluses dans un second temps, mais ne faisant pas partie de l'étude préliminaire, afin de s'assurer que le profil des concentrations de pico-AMH chez ces patientes est similaire à celui observé chez les autres patientes du groupe Aménorrhée.

## **Bibliographie**

1. Goldman KN, Chenette D, Arju R, Duncan FE, Keefe DL, Grifo JA, et al. mTORC1/2 inhibition preserves ovarian function and fertility during genotoxic chemotherapy. *PNAS*. 21 mars 2017;114(12):3186-91.
2. Grosbois J, Demeestere I. Dynamics of PI3K and Hippo signaling pathways during in vitro human follicle activation. *Human Reproduction*. 1 sept 2018;33(9):1705-14.
3. Hsueh AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. *Endocrine Reviews*. 1 févr 2015;36(1):1-24.
4. Shah JS, Sabouni R, Cayton Vaught KC, Owen CM, Albertini DF, Segars JH. Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. juill 2018;35(7):1135-48.
5. Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human Reproduction*. 1 mai 2008;23(5):1151-8.
6. McLaughlin M, Albertini DF, Wallace WHB, Anderson RA, Telfer EE. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 1 mars 2018;24(3):135-42.
7. Bezerra MÉS, Barberino RS, Menezes VG, Gouveia BB, Macedo TJS, Santos JMS, et al. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) promotes primordial follicle growth and reduces DNA fragmentation through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signalling pathway. *Reproduction, Fertility and Development*. 2018;30(11):1503.
8. Nath A, Hakim BA, Rajender S, Singh K, Sachdev M, Konwar R. Effect of insulin supplementation on in vitro maturation of pre-antral follicles from adult and pre-pubertal mice. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. mai 2016;52(5):512-21.

9. Progressive obesity alters ovarian insulin, phosphatidylinositol-3 kinase, and chemical metabolism signaling pathways and potentiates ovotoxicity induced by phosphoramidate mustard in mice† | *Biology of Reproduction* | Oxford Academic [Internet]. [cité 6 janv 2019].

Disponible sur: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/96/2/478/2888999>

10. Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *Journal of Clinical Investigation*. 15 juin 1998;101(12):2622-9.

11. Weil S, Vendola K, Zhou J, Bondy CA. Androgen and Follicle-Stimulating Hormone Interactions in Primate Ovarian Follicle Development. 1999;84(8):6.

12. Peigné M, Decanter C. L'hormone anti-müllérienne, témoin de l'ovario-toxicité de la chimiothérapie à court et long terme. *mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 2014 ; 16 (1) : 39-47 doi:10.1684/mte.2014.0503

13. Bertoldo MJ, Walters KA, Ledger WL, Gilchrist RB, Mermillod P, Locatelli Y. In-vitro regulation of primordial follicle activation: challenges for fertility preservation strategies. *Reproductive BioMedicine Online*. mai 2018;36(5):491-9.

14. Decanter C, Cloquet M, Dassonneville A, D'Orazio E, Mailliez A, Pigny P. Different patterns of ovarian recovery after cancer treatment suggest various individual ovarian susceptibilities to chemotherapy. *Reproductive Biomedicine Online*. juin 2018;36(6):711-8.

15. Kryczek I, Frydman N, Gaudin F, Krzysiek R, Fanchin R, Emilie D, et al. The Chemokine SDF-1/CXCL12 Contributes to T Lymphocyte Recruitment in Human Pre-ovulatory Follicles and Coordinates with Lymphocytes to Increase Granulosa Cell Survival and Embryo Quality. *Am J Reprod Immunol*. nov 2005;54(5):270-83.

16. Mcgee EA, Hsueh AJW. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. 2000;21(2):15.

17. Zegeye MM, Lindkvist M, Fälker K, Kumawat AK, Paramel G, Grenegård M, et al. Activation of the JAK/STAT3 and PI3K/AKT pathways are crucial for IL-6 trans-signaling-mediated pro-inflammatory response in human vascular endothelial cells. *Cell*

Communication and Signaling [Internet]. déc 2018 [cité 15 déc 2018];16(1). Disponible sur: <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-018-0268-4>

18. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. mars 2017;168(6):960-76.

19. Herraiz S, Romeu M, Buigues A, Martínez S, Díaz-García C, Gómez-Seguí I, et al. Autologous stem cell ovarian transplantation to increase reproductive potential in patients who are poor responders. *Fertility and Sterility*. août 2018;110(3):496-505.e1.

20. Cervelló I, Gil-Sanchis C, Santamaría X, Cabanillas S, Díaz A, Faus A, et al. Human CD133+ bone marrow-derived stem cells promote endometrial proliferation in a murine model of Asherman syndrome. *Fertility and Sterility*. déc 2015;104(6):1552-1560.e3.

21. Zhang Q, Bu S, Sun J, Xu M, Yao X, He K, et al. Paracrine effects of human amniotic epithelial cells protect against chemotherapy-induced ovarian damage. *Stem Cell Research & Therapy*. 28 nov 2017;8(1):270.

22. Cohen J, Chabbert-Buffet N, Darai E. Diminished ovarian reserve, premature ovarian failure, poor ovarian responder—a plea for universal definitions. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. déc 2015;32(12):1709-12.

23. Bertrand-Delepine J, Decanter C, Robin G. Les insuffisances ovariennes prématurées secondaires à la chimiothérapie : quelles molécules ? Quels mécanismes ? *mt Médecine de la Reproduction. Gynécologie Endocrinologie* 2017 ; 19 (1) : 29-38 doi : 10.1684/mte.2017.0648.

24. Paclitaxel-Induced Nuclear Translocation of FOXO3a in Breast Cancer Cells Is Mediated by c-Jun NH2-Terminal Kinase and Akt | *Cancer Research* [Internet]. [cité 21 févr 2019]. Disponible sur: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/66/1/212.long>

25. Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S, et al. Cyclophosphamide Triggers Follicle Activation and « Burnout »; AS101 Prevents Follicle Loss and Preserves Fertility. *Science Translational Medicine*. 15 mai 2013;5(185):185ra62-185ra62.

26. Chang EM, Lim E, Yoon S, Jeong K, Bae S, Lee DR, et al. Cisplatin Induces Overactivation of the Dormant Primordial Follicle through PTEN/AKT/FOXO3a Pathway

which Leads to Loss of Ovarian Reserve in Mice. PLOS ONE. 14 déc 2015;10(12):e0144245.

27. Roness H, Kalich-Philosoph L, Meiorow D. Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: possible roles for hormonal and non-hormonal attenuating agents. *Hum Reprod Update*. 1 sept 2014;20(5):759-74.

28. Decanter C. Stratégies de préservation de la fertilité chez la femme traitée pour cancer. *mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 2012; 14 (2) : 117-20 doi:10.1684/mte.2012.0405

29. Clyne B, Olshaker JS. The C-reactive protein. *The Journal of Emergency Medicine*. nov 1999;17(6):1019-25.

30. McFadyen JD, Kiefer J, Braig D, Loseff-Silver J, Potempa LA, Eisenhardt SU, et al. Dissociation of C-Reactive Protein Localizes and Amplifies Inflammation: Evidence for a Direct Biological Role of C-Reactive Protein and Its Conformational Changes. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cité 18 déc 2018];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01351/full>

31. Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cité 18 déc 2018];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00754/full>

32. Lamblin N. Quelle place pour les marqueurs de l'inflammation ? – Which role for inflammation markers? *La lettre du Cardiologue* - n°427- septembre 2009.

33. Dinh KM, Kaspersen KA, Mikkelsen S, Pedersen OB, Petersen MS, Thørner LW, et al. Low-grade inflammation is negatively associated with physical Health-Related Quality of Life in healthy individuals: Results from The Danish Blood Donor Study (DBDS). Tauler P, éditeur. PLOS ONE. 28 mars 2019;14(3):e0214468.

34. Goff David C., Lloyd-Jones Donald M., Bennett Glen, Coady Sean, D'Agostino Ralph B., Gibbons Raymond, et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the Assessment of Cardiovascular Risk. *Circulation*. 24 juin 2014;129(25\_suppl\_2):S49-73.

35. Balduyck M, Odou M-F, Zerimech F, Porchet N, Lafitte J-J, Maitre B. Diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency: Modalities, indications and diagnosis strategy. *Revue des Maladies Respiratoires*. oct 2014;31(8):729-45.

36. Ehlers MR. Immune-modulating effects of alpha-1 antitrypsin. *Biological Chemistry* [Internet]. 1 janv 2014 [cité 19 déc 2018];395(10). Disponible sur: <https://www.degruyter.com/view/j/bchm.2014.395.issue-10/hsz-2014-0161/hsz-2014-0161.xml>
37. Fradelizi D. Cytokines : médiateurs de la réponse immunitaire, de la réaction inflammatoire et de l'hématopoïèse. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Hématologie*, 13-000-M-84, 1999, 7 p.
38. O'Shea JJ, Gadina M, Siegel RM. Cytokines and Cytokine Receptors. *Clinical Immunology, Principles and Practice*. 5th edition. Editors : Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Frew AJ, Schroeder HW, Weyand CM, Elsevier, 2019. p127-p155.e1.
39. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A, Masson PL. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson, DL 2016.; 2016. (Campus référence).
40. Leung-Theung-Long S, Guerder S. Les cellules Th17: Une nouvelle population de cellules T CD4 effectrices pro-inflammatoires. *médecine/sciences*. nov 2008;24(11):972-6.
41. Noack M, Kolopp-Sarda M-N. Cytokines et inflammation : physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Revue Francophone des Laboratoires*. févr 2018;(499):28-37.
42. Hamäi A, Muret J, Cavalcanti A, Bonvalot S, Chouaïb S. Le facteur de nécrose tumorale: de la biologie à la thérapie oncologique. *Hématologie*. juill 2009;(4):291–304.
43. Jundi K, Greene C. Transcription of Interleukin-8: How Altered Regulation Can Affect Cystic Fibrosis Lung Disease. *Biomolecules*. 1 juill 2015;5(3):1386-98.
44. Murphy PM. Chemokines and Chemokine Receptors. *Clinical Immunology, Principles and Practice*. 5th edition. Editors : Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Frew AJ, Schroeder HW, Weyand CM, Elsevier, 2019. p157-170.e1.
45. Combadière B, Combadière C, Deterre P. Les chimiokines : un réseau sophistiqué de guidage cellulaire. *médecine/sciences*. févr 2007;23(2):173-9.



46. Chemokine/chemokine receptor nomenclature IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature. *Journal of Immunological Methods*. avr 2002;262(1-2):1-3.
47. Cousin P, Pugeat M. La sex hormone-binding globulin (SHBG) : biologie et intérêt en pathologie endocrinienne et métabolique. *Médecine thérapeutique / Endocrinologie*. 3 juill 2001;3(3):245-51.
48. Hammond GL. Diverse Roles for Sex Hormone-Binding Globulin in Reproduction. *Biol Reprod*. sept 2011;85(3):431-41.
49. Racadot A. La «Sex-Binding Protein ou SBP (protéine de transport des hormones sexuelles)». *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. juin 1990;5(3):17-27.
50. Loukovaara M, Carson M, Adlercreutz H. Regulation of production and secretion of sex hormone-binding globulin in HepG2 cell cultures by hormones and growth factors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. janv 1995;80(1):160-4.
51. Plymate SR, Matej LA, Jones RE, Friedl KE. Inhibition of Sex Hormone-Binding Globulin Production in the Human Hepatoma (Hep G2) Cell Line by Insulin and Prolactin\*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. sept 1988;67(3):460-4.
52. Nestler J. Obesity, insulin, sex steroids and ovulation. *International Journal of Obesity*. juin 2000;24(S2):S71-3.
53. Simó R, Sáez-López C, Barbosa-Desongles A, Hernández C, Selva DM. Novel insights in SHBG regulation and clinical implications. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. juill 2015;26(7):376-83.
54. Ding EL, Song Y, Manson JE, Hunter DJ, Lee CC, Rifai N, et al. Sex Hormone-Binding Globulin and Risk of Type 2 Diabetes in Women and Men. *New England Journal of Medicine*. 17 sept 2009;361(12):1152-63.
55. Ahima RS, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 1 oct 2000;11(8):327-32.
56. Naylor C, Petri WA. Leptin Regulation of Immune Responses. *Trends in Molecular Medicine*. févr 2016;22(2):88-98.

57. Bouret SG, Caron É, Steculorum S, Ishii Y, Sachot C. Leptine et contrôle hypothalamique de la reproduction. *mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 2008 ; 10 (2) : 74-84.
58. Garcia-Galiano D, Borges BC, Allen SJ, Elias CF. PI 3K signalling in leptin receptor cells: Role in growth and reproduction. *J Neuroendocrinol.* mai 2019;31(5):e12685.
59. Joo J-K, Joo B-S, Kim S-C, Choi J-R, Park S-H, Lee K-S. Role of leptin in improvement of oocyte quality by regulation of ovarian angiogenesis. *Animal Reproduction Science.* juin 2010;119(3-4):329-34.
60. Sahdo B, Fransén K, Asfaw Idosa B, Eriksson P, Söderquist B, Kelly A, et al. Cytokine Profile in a Cohort of Healthy Blood Donors Carrying Polymorphisms in Genes Encoding the NLRP3 Inflammasome. Chamailard M, éditeur. *PLoS ONE.* 3 oct 2013;8(10):e75457.
61. Wolf RM, Jaffe AE, Steele KE, Schweitzer MA, Magnuson TH, Wolfe A, et al. Cytokine, Chemokine, and Cytokine Receptor Changes Are Associated With Metabolic Improvements After Bariatric Surgery. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1 mars 2019;104(3):947-56.
62. Sun S, Chen H, Zheng X, Ma C, Yue R. Analysis on the level of IL-6, IL-21, AMH in patients with auto-immunity premature ovarian failure and study of correlation. *Exp Ther Med [Internet].* 10 août 2018 [cité 1 juin 2019]; Disponible sur: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2018.6592>
63. Sjaarda LA, Radin RG, Swanson C, Kuhr DL, Mumford SL, Galai N, et al. Prevalence and Contributors to Low-grade Inflammation in Three U.S. Populations of Reproductive Age Women. *Paediatr Perinat Epidemiol.* janv 2018;32(1):55-67.
64. Jezela-Stanek A, Chorostowska-Wynimko J. Beyond the lungs: Alpha-1 antitrypsin's potential role in human gestation. *Adv Clin Exp Med.* 27 mars 2019;28(9):0-0.
65. Duffy DM, Ko C, Jo M, Brannstrom M, Curry TE. Ovulation: Parallels With Inflammatory Processes. *Endocrine Reviews.* 1 avr 2019;40(2):369-416.

66. Baskind NE, Orsi NM, Sharma V. Follicular-phase ovarian follicular fluid and plasma cytokine profiling of natural cycle in vitro fertilization patients. *Fertility and Sterility*. août 2014;102(2):410-8.
67. Capobianco G, de Muro P, Cherchi GM, Formato M, Lepedda AJ, Cigliano A, et al. Plasma levels of C-reactive protein, leptin and glycosaminoglycans during spontaneous menstrual cycle: differences between ovulatory and anovulatory cycles. *Arch Gynecol Obstet*. août 2010;282(2):207-13.
68. Su H-CI, Haunschild C, Chung K, Komrokian S, Boles S, Sammel MD, et al. Prechemotherapy antimullerian hormone, age, and body size predict timing of return of ovarian function in young breast cancer patients: AMH Predicts Return of Ovarian Function. *Cancer*. 1 déc 2014;120(23):3691-8.
69. Pistilli B, Mazouni C, Zingarello A, Faron M, Saghatchian M, Grynberg M, Spielmann M, Kerbrat P, Roché H, Lorgis V, Bachelot T, Campone M, Levy C, Gonçalves A, Lesur A, Veyret C, Vanlemmens L, Lemonnier J, Delalogue S. Individualized Prediction of Menses Recovery After Chemotherapy for Early-stage Breast Cancer : A Nomogram Developed From UNICANCER PACS04 et PACS05 Trials. *Clinical Breast Cancer*, Vol. 19, No. 1, 63-70. 2018 Elsevier Inc.
70. Kim H-A, Choi J, Park CS, Seong M-K, Hong S-E, Kim J-S, et al. Post-chemotherapy serum anti-Müllerian hormone level predicts ovarian function recovery. *Endocrine Connections*. août 2018;7(8):949-56.
71. Min YH, Lee JW, Chung IY, Ahn SH. Longitudinal patterns and associated factors of postdiagnosis weight changes in Korean breast cancer survivors with normal body mass index. *Support Care Cancer*. août 2017;25(8):2549-58.
72. Gordon AM, Hurwitz S, Shapiro CL, LeBoff MS. Premature ovarian failure and body composition changes with adjuvant chemotherapy for breast cancer: Menopause. *Menopause*. nov 2011;18(11):1244-8.



**AUTEUR : Nom :** LOISON

**Prénom :** Isabelle

**Date de Soutenance :** 11 octobre 2019

**Titre de la Thèse :** Etude de l'influence de marqueurs inflammatoires et nutritionnels sur la récupération de la fonction ovarienne post-chimiothérapie

**Thèse - Médecine - Lille 2019**

**Cadre de classement :** Biologie Médicale

**DES + spécialité :** Biologie Médicale, spécialité Biochimie

**Mots-clés :** Cancer du sein, chimiothérapie, récupération de la fonction ovarienne précoce, folliculogenèse ovarienne, voie PI3K/Akt/mTORC1, IL-6, BMI

**Contexte :** Deux profils de récupération de la fonction ovarienne précoce peuvent être distingués chez des jeunes patientes ayant été traitées pour un cancer du sein par le même protocole de chimiothérapie (CT) selon leur statut menstruel à + 6 mois post-CT : un profil de récupération rapide (Groupe Cyclée) et un profil de récupération lent (groupe Aménorrhée). La folliculogenèse ovarienne précoce est régulée par la voie de signalisation PI3K/Akt/mTORC1 (Phosphatidylinositol 4,5 - biphosphate 3 - kinase / Protein kinase B / mammalian Target Of Rapamycin) qui contrôle la balance entre le nombre de follicules primordiaux quiescents et le pool de follicules en croissance dans l'ovaire. Notre hypothèse de travail était que des marqueurs inflammatoires et nutritionnels influençant la voie PI3K/Akt/mTORC1 pouvaient expliquer le type de profil de récupération de la fonction ovarienne post-CT.

**Patientes et Méthode :** Des marqueurs biologiques du statut inflammatoire : protéine C réactive ultra-sensible,  $\alpha$ -1-antitrypsine, interleukine (IL) -1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor- $\alpha$ , et du statut nutritionnel : BMI (body mass index), leptine, sex-binding protéin, ont été dosés au niveau sanguin chez des patientes du groupe Cyclée (n =8) et des patientes du groupe Aménorrhée (n = 11) tous les 3 mois dans l'année suivant la fin de la CT.

**Résultats :** Les patientes du groupe Cyclée présentaient en fin de CT (p = 0.03) et à + 9 mois de la fin de la CT (p = 0.009), des concentrations d'IL-6 significativement plus élevées que les patientes du groupe Aménorrhée. Les patientes du groupe Cyclée présentaient au diagnostic (p = 0.02) et en fin de CT (p = 0.02) un BMI plus élevé que les patientes du groupe Aménorrhée, cependant les concentrations sériques de leptine ne différaient pas à aucun temps entre les deux groupes.

**Conclusion :** Le poids des patientes au diagnostic et en fin de CT semble influencer la reprise des cycles menstruels en post-CT, mais nous n'avons pas mis en évidence d'influence de la composition corporelle en masse grasse. Alors que les valeurs d'IL-6 des patientes du groupe Cyclée sont comparables à celles de sujets contrôles dans la littérature, les concentrations d'IL-6 des patientes du groupe Aménorrhée sont plus basses. Nos résultats suggèrent que le BMI et l'IL-6 agissent dans l'ovaire comme des facteurs de levée de la quiescence folliculaire.

**Composition du Jury :**

**Présidente :** Pr Myriam LABALETTE

**Asseseurs :** Dr Susanna SCHRAEN, Dr Christine DECANter

**Directeur de thèse :** Pr Pascal PIGNY