

Académie d'Orléans –Tours
Université François-Rabelais

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Année 2014

N°

Thèse

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'Etat

Par

CELTON Noémie
Née le 6 février 1984

Présentée et soutenue publiquement le 31 octobre 2014

Fécondation *in vitro* avec transfert embryonnaire différé : résultat d'une étude cas / témoin.

Jury

Président : Monsieur le Professeur Dominique Royère, CHRU de Tours

Membres : Madame le Docteur Virginie Barraud-Lange, Hôpital Cochin, Paris
Monsieur le Professeur Fabrice Guérif, CHRU de Tours
Madame le Professeur Catherine Patrat, Hôpital Bichat, Paris
Madame le Docteur Marie-Laure Couet, CHRU de Tours

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Professeur Patrice DIOT

VICE-DOYEN

Professeur Henri MARRET

ASSESEURS

Professeur Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*
Professeur Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Professeur Hubert LARDY, *Moyens – relations avec l'Université*
Professeur Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, *Médecine générale*
Professeur François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*
Professeur Philippe ROINGEARD, *Recherche*

SECRETAIRE GENERALE

Madame Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Professeur Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Professeur Georges DESBUQUOIS (†)- 1966-1972
Professeur André GOUAZÉ - 1972-1994
Professeur Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004
Professeur Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES

Professeur Alain AUTRET
Professeur Catherine BARTHELEMY
Professeur Jean-Claude BESNARD
Professeur Patrick CHOUTET
Professeur Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Professeur Guy GINIES
Professeur Olivier LE FLOCH
Professeur Etienne LEMARIE
Professeur Chantal MAURAGE
Professeur Léandre POURCELOT
Professeur Michel ROBERT
Professeur Jean-Claude ROLLAND

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Ph. ANTHONIOZ - A. AUDURIER – Ph. BAGROS - G. BALLON – P. BARDOS - J. BARSOTTI
A. BENATRE - Ch. BERGER – J. BRIZON - Mme M. BROCHIER - Ph. BURDIN - L. CASTELLANI
J.P. FAUCHIER - B. GRENIER – A. GOUAZE – M. JAN – J.-P. LAMAGNERE - F. LAMISSE – J. LANSAC – J.
LAUGIER - G. LELORD - G. LEROY - Y. LHUINTRE - M. MAILLET - Mlle C. MERCIER – J. MOLINE - CI.
MORAINE - J.P. MUH - J. MURAT - Ph. RAYNAUD – JC. ROLLAND – Ch. ROSSAZZA - Ph. ROULEAU - A.
SAINDELLE - J.J. SANTINI - D. SAUVAGE – J. THOUVENOT - B. TOUMIEUX - J. WEILL.

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

| | | |
|-----|-------------------------------------|--|
| MM. | ALISON Daniel..... | Radiologie et Imagerie médicale |
| | ANDRES Christian..... | Biochimie et Biologie moléculaire |
| | ANGOULVANT Denis..... | Cardiologie |
| | ARBEILLE Philippe..... | Biophysique et Médecine nucléaire |
| | AUPART Michel..... | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire |
| | BABUTY Dominique..... | Cardiologie |
| | BALLON Nicolas..... | Psychiatrie ; Addictologie |
| Mme | BARILLOT Isabelle..... | Cancérologie ; Radiothérapie |
| MM. | BERNARD Louis..... | Maladies infectieuses ; maladies tropicales |
| | BEUTTER Patrice..... | Oto-Rhino-Laryngologie |
| | BINET Christian..... | Hématologie ; Transfusion |
| | BODY Gilles..... | Gynécologie et Obstétrique |
| | BONNARD Christian..... | Chirurgie infantile |
| | BONNET Pierre..... | Physiologie |
| Mme | BONNET-BRILHAULT Frédérique..... | Physiologie |
| MM. | BOUGNOUX Philippe..... | Cancérologie ; Radiothérapie |
| | BRILHAULT Jean..... | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| | BRUNEREAU Laurent..... | Radiologie et Imagerie médicale |
| | BRUYERE Franck..... | Urologie |
| | BUCHLER Matthias..... | Néphrologie |
| | CALAIS Gilles..... | Cancérologie ; Radiothérapie |
| | CAMUS Vincent..... | Psychiatrie d'adultes |
| | CHANDENIER Jacques..... | Parasitologie et Mycologie |
| | CHANTEPIE Alain..... | Pédiatrie |
| | COLOMBAT Philippe..... | Hématologie ; Transfusion |
| | CONSTANS Thierry..... | Médecine interne ; Gériatrie et Biologie du vieillissement |
| | CORCIA Philippe..... | Neurologie |
| | COSNAY Pierre..... | Cardiologie |
| | COTTIER Jean-Philippe..... | Radiologie et Imagerie médicale |
| | COUET Charles..... | Nutrition |
| | DANQUECHIN DORVAL Etienne..... | Gastroentérologie ; Hépatologie |
| | DE LA LANDE DE CALAN Loïc..... | Chirurgie digestive |
| | DE TOFFOL Bertrand..... | Neurologie |
| | DEQUIN Pierre-François..... | Thérapeutique ; médecine d'urgence |
| | DESTRIEUX Christophe..... | Anatomie |
| | DIOT Patrice..... | Pneumologie |
| | DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague..... | Anatomie & Cytologie pathologiques |
| | DUMONT Pascal..... | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire |
| | EL HAGE Wissam..... | Psychiatrie adultes |
| | FAUCHIER Laurent..... | Cardiologie |
| | FAVARD Luc..... | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| | FOUQUET Bernard..... | Médecine physique et de Réadaptation |
| | FRANCOIS Patrick..... | Neurochirurgie |
| | FROMONT-HANKARD Gaëlle..... | Anatomie & Cytologie pathologiques |
| | FUSCIARDI Jacques..... | Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence |
| | GAILLARD Philippe..... | Psychiatrie d'Adultes |
| | GYAN Emmanuel..... | Hématologie ; thérapie cellulaire |
| | GOGA Dominique..... | Chirurgie maxillo-faciale et Stomatologie |
| | GOUDEAU Alain..... | Bactériologie -Virologie ; Hygiène hospitalière |
| | GOUPILLE Philippe..... | Rhumatologie |
| | GRUEL Yves..... | Hématologie ; Transfusion |
| | GUERIF Fabrice..... | Biologie et Médecine du développement et de la reproduction |
| | GUILMOT Jean-Louis..... | Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire |
| | GUYETANT Serge..... | Anatomie et Cytologie pathologiques |
| | HAILLOT Olivier..... | Urologie |
| | HALIMI Jean-Michel..... | Thérapeutique ; médecine d'urgence (Néphrologie et Immunologie clinique) |
| | HANKARD Régis..... | Pédiatrie |
| | HERAULT Olivier..... | Hématologie ; transfusion |
| | HERBRETEAU Denis..... | Radiologie et Imagerie médicale |
| Mme | HOMMET Caroline..... | Médecine interne, Gériatrie et Biologie du vieillissement |
| MM. | HUTEN Noël..... | Chirurgie générale |
| | LABARTHE François..... | Pédiatrie |
| | LAFFON Marc..... | Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence |
| | LARDY Hubert..... | Chirurgie infantile |
| | LASFARGUES Gérard..... | Médecine et Santé au Travail |
| | LAURE Boris..... | Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie |
| | LEBRANCHU Yvon..... | Immunologie |
| | LECOMTE Thierry..... | Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie |

| | | |
|-----|-------------------------------|---|
| | LESCANNE Emmanuel | Oto-Rhino-Laryngologie |
| | LINASSIER Claude | Cancérologie ; Radiothérapie |
| | LORETTE Gérard | Dermato-Vénérologie |
| | MACHET Laurent | Dermato-Vénérologie |
| | MAILLOT François | Médecine Interne |
| | MARCHAND-ADAM Sylvain | Pneumologie |
| | MARRET Henri | Gynécologie et Obstétrique |
| | MARUANI Annabel | Dermatologie |
| | MEREGHETTI Laurent | Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière |
| | MORINIERE Sylvain | O.R.L. |
| | MULLEMAN Denis | Rhumatologie |
| | PAGES Jean-Christophe | Biochimie et biologie moléculaire |
| | PAINTAUD Gilles | Pharmacologie fondamentale, Pharmacologie clinique |
| | PATAT Frédéric | Biophysique et Médecine nucléaire |
| | PERROTIN Dominique | Réanimation médicale ; médecine d'urgence |
| | PERROTIN Franck | Gynécologie et Obstétrique |
| | PISELLA Pierre-Jean | Ophthalmologie |
| | QUENTIN Roland | Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière |
| | REMERAND Francis | Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale |
| | ROBIER Alain | Oto-Rhino-Laryngologie |
| | ROINGEARD Philippe | Biologie cellulaire |
| | ROSSET Philippe | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| | ROYERE Dominique | Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction |
| | RUSCH Emmanuel | Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention |
| | SALAME Ephrem | Chirurgie digestive |
| | SALIBA Elie | Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction |
| Mme | SANTIAGO-RIBEIRO Maria | Biophysique et Médecine Nucléaire |
| MM. | SIRINELLI Dominique | Radiologie et Imagerie médicale |
| | THOMAS-CASTELNAU Pierre | Pédiatrie |
| Mme | TOUTAIN Annick | Génétique |
| MM. | VAILLANT Loïc | Dermato-Vénérologie |
| | VELUT Stéphane | Anatomie |
| | WATIER Hervé | Immunologie. |

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

Mme LEHR-DRYLEWICZ Anne-MarieMédecine Générale

PROFESSEURS ASSOCIES

MM. LEBEAU Jean-PierreMédecine Générale
MALLET Donatien.....Soins palliatifs
POTIER Alain.....Médecine Générale
ROBERT JeanMédecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme ANGOULVANT Théodora.....Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique : addictologie
M. BAKHOS David.....Physiologie
Mme BERNARD-BRUNET Anne.....Cardiologie A
M. BERTRAND PhilippeBiostatistiques, Informatique médical et Technologies de Communication
Mme BLANCHARD EmmanuelleBiologie cellulaire
BLASCO HélèneBiochimie et biologie moléculaire
M. BOISSINOT ÉricPhysiologie
Mme CAILLE AgnèsCentre d'investigation clinique
M. DESOUBEAUX Guillaume.....Parasitologie et mycologie
Mme DUFOUR DianeBiophysique et Médecine nucléaire
M. EHRMANN StephanRéanimation médicale
Mme FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie..Anatomie et Cytologie pathologiques
M. GATAULT Philippe.....Néphrologie
Mmes GAUDY-GRAFFIN Catherine.....Bactériologie - Virologie ; Hygiène hospitalière
GUILLEUX ValérieImmunologie
GUILLON-GRAMMATICO Leslie.....SIMEES
MM. HOARAU Cyrille.....Immunologie
HOURIOUX ChristopheBiologie cellulaire
Mmes LARTIGUE Marie-FrédériqueBactériologie - Virologie ; Hygiène hospitalière
LE GUELLEC ChantalPharmacologie fondamentale ; Pharmacologie clinique
MACHET Marie-ChristineAnatomie et Cytologie pathologiques

| | | |
|-----|---------------------------------|--|
| MM. | PIVER Eric | Biochimie et biologie moléculaire |
| | ROUMY Jérôme..... | Biophysique et médecine nucléaire in vitro |
| Mme | SAINT-MARTIN Pauline | Médecine légale et Droit de la santé |
| MM. | SAMIMI Mahtab | Dermatologie |
| | TERNANT David..... | Pharmacologie – toxicologie |
| Mme | VALENTIN-DOMELIER Anne-Sophie.. | Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière |
| M. | VOURC'H Patrick..... | Biochimie et Biologie moléculaire |

MAITRES DE CONFERENCES

| | | |
|-----|-----------------------|-----------------------------------|
| Mme | ESNARD Annick | Biologie cellulaire |
| M. | LEMOINE Maël..... | Philosophie |
| Mme | MONJAUZE Cécile | Sciences du langage - Orthophonie |
| M. | PATIENT Romuald | Biologie cellulaire |

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

| | | |
|------|-----------------------------|-------------------|
| Mmes | HUAS Caroline..... | Médecine Générale |
| | RENOUX-JACQUET Cécile | Médecine Générale |
| M. | ROBERT Jean | Médecine Générale |

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

| | | |
|------|-------------------------------|---|
| M. | BOUAKAZ Ayache | Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930 |
| Mmes | BRUNEAU Nicole | Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930 |
| | CHALON Sylvie..... | Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930 |
| MM. | CHARBONNEAU Michel..... | Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292 |
| | COURTY Yves..... | Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100 |
| | GAUDRAY Patrick | Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292 |
| | GILOT Philippe | Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282 |
| | GOUILLEUX Fabrice | Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292 |
| Mmes | GOMOT Marie | Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930 |
| | GRANDIN Nathalie | Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292 |
| | HEUZE-VOURCH Nathalie..... | Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930 |
| MM. | KORKMAZ Brice | Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100 |
| | LAUMONNIER Frédéric..... | Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 930 |
| | LE PAPE Alain | Directeur de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100 |
| Mme | MARTINEAU Joëlle | Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930 |
| MM. | MAZURIER Frédéric..... | Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292 |
| | MEUNIER Jean-Christophe | Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 966 |
| | RAOUL William..... | Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292 |
| Mme | RIO Pascale..... | Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1069 |
| M. | SI TAHAR Mustapha..... | Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100 |

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour la Faculté de Médecine

| | | |
|------|--------------------------|---|
| Mme | BIRMELE Béatrice | Praticien Hospitalier (<i>éthique médicale</i>) |
| M. | BOULAIN Thierry | Praticien Hospitalier (<i>CSCT</i>) |
| Mme | CRINIÈRE Lise | Praticien Hospitalier (<i>endocrinologie</i>) |
| M. | GAROT Denis..... | Praticien Hospitalier (<i>sémiologie</i>) |
| Mmes | MAGNAN Julie..... | Praticien Hospitalier (<i>sémiologie</i>) |
| | MERCIER Emmanuelle | Praticien Hospitalier (<i>CSCT</i>) |

Pour l'Ecole d'Orthophonie

| | | |
|-----|------------------------|-----------------------|
| Mme | DELORE Claire | Orthophoniste |
| MM. | GOUIN Jean-Marie | Praticien Hospitalier |
| | MONDON Karl | Praticien Hospitalier |
| Mme | PERRIER Danièle..... | Orthophoniste |

Pour l'Ecole d'Orthoptie

| | | |
|-----|-----------------------|-----------------------|
| Mme | LALA Emmanuelle | Praticien Hospitalier |
| M. | MAJZOUB Samuel..... | Praticien Hospitalier |

RÉSUMÉ

Introduction :

Une tentative de fécondation *in vitro* se déroule en 3 grandes étapes qui classiquement s'enchaînent : recueil des ovocytes et des spermatozoïdes, mise en fécondation de ces gamètes puis transfert d'un des embryons obtenus quelques jours plus tard dans l'utérus. Malgré tous les efforts pour sélectionner un embryon paraissant évolutif lors du transfert, l'implantation dans l'utérus échoue dans plus de la moitié des cas. Dans le but d'améliorer ces résultats, une nouvelle stratégie émerge actuellement : Le transfert embryonnaire différé (« freeze all »). Dans cette prise en charge, le transfert embryonnaire est désynchronisé du reste de la tentative en congelant tous les embryons pour réaliser le transfert à distance de la stimulation ovarienne sur un endomètre plus naturel. En effet dans la littérature, nombre d'articles font part des effets potentiellement délétères des concentrations hormonales supra physiologiques sur l'endomètre secondaire à la stimulation ovarienne pluri folliculaires. Cependant, il existe très peu d'études solides évaluant le bénéfice réel de cette stratégie de prise en charge et l'intérêt du transfert embryonnaire différé reste encore à prouver.

Matériels et méthodes:

Une étude rétrospective de type cas / témoin a été réalisée sur 18 mois à l'hôpital Cochin : 231 tentatives ayant bénéficié d'un transfert différé pour différentes indications (échecs d'implantation répétés, risque d'hyperstimulation ovarienne, évènements intercurrents en cours de stimulation) ont été appariées à 231 tentatives ayant bénéficié d'un transfert d'embryons frais. Le critère de jugement principal était le taux de grossesse clinique (GC) par tentative. Les critères de jugement secondaires étaient : le taux d'implantation, le taux de grossesse clinique par transfert, le taux de fausse couche spontanée (FCS) et le taux cumulé de grossesse clinique par tentative. Une régression logistique a été réalisée pour prendre en compte les facteurs confondants.

Résultats :

En analyse univariée, il n'a pas été observé de différence significative entre les groupes frais et différé en termes de taux de GC par tentative (respectivement 36% vs 31%, $p=0.21$), taux d'implantation (20,5% vs 16,6% ; $p=0,34$), taux de GC par transfert (39% vs 35%, $p=0.38$), et taux cumulé de GC par tentative (41,0% vs 40,3%, $p=1$). Le taux de FCS était par contre lui significativement plus élevé dans le groupe avec transfert embryonnaire différé (9.5% vs 30%, $p=0.003$). En analyse multivariée, le transfert embryonnaire apparaît comme défavorable pour la survenue d'une grossesse avec un odd ratio à 0,59 (IC95% 0,48-0,74, $p=0,02$).

Conclusion:

Pour les tentatives où le transfert différé est nécessaire pour raisons médicales notamment lors d'un risque d'hyperstimulation, cette stratégie permet de sécuriser la prise en charge des patientes en FIV tout en conservant des chances de grossesse très satisfaisantes. Par contre, contrairement aux données de la littérature, notre analyse met en évidence une diminution des chances de grossesse avec cette stratégie. De plus, la crainte d'un effet cytotoxique de la congélation apparaît devant l'augmentation du nombre de FCS dans le groupe transfert différé. Cette étude devra être poursuivie pour conclure définitivement sur les taux de naissance vivante par tentative.

MOTS CLES : Transfert embryonnaire différé, réceptivité endométriale, congélation embryonnaire

TITLE :IVF Cycle with differed transfer: a matched case -control study

ABSTRACT

Background:

In Vitro Fertilisation (IVF) cycle typically consists in three successive steps: Controlled ovarian stimulation (COS), fertilisation and embryo transfer. Despite medical team efforts to choose an evolutive embryo for transfer, the implantation process still fails in more than half of the cases. “Freeze all” is a new strategy which aims to improve implantation rate by using deferred embryo transfer on a natural endometrium. Although many studies have shown endometrial impairment after COS, more evidences are needed in order to truly conclude on the potential benefits of this strategy.

Methods:

A retrospective matched case-control study was conducted over a 18 months period at the Hospital of Cochin. A total of 231 cycles with deferred embryo transfer for different indications were matched with 231 cycles with fresh transfer. The main outcome measurement was the clinical pregnancy rate by cycle.

Results:

Multiple logistic regression analysis indicated that the “freeze all” strategy is associated with lower chance of clinical pregnancy ($p=0,02$). The odd ratio for clinical pregnancy relative to a fresh cycle was 0,59 (95%CI 0,48-0,74). Moreover spontaneous abortion was significantly higher in the “freeze all” group (29,6% vs 9,5%, $p=0,003$). No hospitalization for ovarian hyper stimulation syndrome (OHSS) occurs thanks to this strategy during the sudy period.

Conclusions:

Using the “freeze-all” strategy for IVF attempts with mandatory deferred transfer (e.g. high risk of OHSS) secures patient management while preserving acceptable chances of pregnancy. However, unlike most evidences found in the literature, this work showed that the use of deferred transfer potentially decreases the overall chances of pregnancy. Moreover, higher spontaneous abortion has been observed in the deferred transfer group, suggesting potential cytotoxic effects that may be caused by the freezing process. More studies will be needed to evaluate the effect of “freeze all” strategy on life birth.

MOTS CLES: differed embryo transfer, freeze all, endometrium receptivity, frozen embryo transfer

Serment d'Hippocrate

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis à l'intérieur des maisons,
mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe,
ma langue taira les secrets qui me seront confiés
et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs
ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

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

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

Remerciements

Docteur Virginie Barraud-Lange

Merci de m'avoir si bien encadrée pour ce travail. J'en garderai un très bon souvenir. J'ai beaucoup appris auprès de toi et de toute l'équipe de Cochin. Trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Professeur Fabrice Guérif

Merci d'avoir guidé mon apprentissage par ta constante rigueur et tes conseils précieux. Je suis fière d'être de formation Tourangelle. J'aurais beaucoup aimé continuer un bout de route avec vous. Je te prie d'accepter ma sincère gratitude et mon plus profond respect.

Professeur Dominique Royère

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse, je vous en remercie. Merci aussi pour les discussions et les réponses que vous avez pu m'apporter lors de vos passages réguliers dans le service. Veuillez croire en l'expression de mon plus sincère respect.

Professeur Catherine Patrat, Docteur Marie-Laure Couet

Vous avez accepté de juger ce travail avec gentillesse et spontanéité. Je suis très sensible à cet honneur. Veuillez croire en l'expression de mes plus sincères remerciements.

**Docteur Cynthia Frapsauce, Docteur Elodie Poisson, Docteur Céline Bouillon,
et Docteur Jennifer Carrière**

Merci d'avoir été des collègues formidables. Je vous souhaite bonne route ; Puisse-t-elle recroiser la mienne aussi souvent que possible.

Rachel Bidault, Charline Chavez et Olivier Gasnier

Vous avez guidé mes premiers pas dans cette belle spécialité par votre bienveillance et vos précieux conseils. Encore une fois, je suis fière d'avoir été formée dans votre équipe et j'aurais adorée continuer l'aventure avec vous. Merci mille fois !

**Maryline Jahan, Armony Allemand, Daniel Brochard, Chantal Suire, Véronique Ract,
Olivia Gervereau, Michel Lanoue et Laurence Bourgeois**

Vous êtes une équipe formidable, vous allez me manquer. Bonne continuation à l'équipe Tourangelle !

Timothée Dub et Vincent Le Guilloux

Parce que sans vos compétences informatiques et statistiques, ce travail n'aurait pas été possible ☺

A mon père, ma mère et ma sœur

Mais surtout, à Vincent et à Eliot

Table des matières

| | |
|---|----|
| Abréviations | 1 |
| Introduction | 3 |
| 1 Généralités | 3 |
| 1.1 La congélation embryonnaire | 4 |
| 1.1.1 La congélation lente | 4 |
| 1.1.2 La vitrification..... | 5 |
| 1.2 Physiologie de l'endomètre et implantation | 6 |
| 1.2.1 L'endomètre | 6 |
| 1.2.2 L'implantation..... | 7 |
| 2 Fondements du transfert différé | 8 |
| 2.1 La congélation embryonnaire aujourd'hui | 9 |
| 2.2 Effet de la stimulation sur l'endomètre | 11 |
| 2.3 La synchronisation embryon/endomètre | 11 |
| 2.4 Issues obstétricales en FIV | 13 |
| 2.5 Les études comparatives « transfert frais/transfert différé » | 14 |
| Matériels et méthodes | 16 |
| 1 Population | 16 |
| 2 Protocole de FIV | 18 |
| 2.1 Stimulation..... | 18 |

| | | |
|-----|---|-----------|
| 2.2 | Mise en fécondation et culture embryonnaire | 18 |
| 2.3 | Transfert..... | 20 |
| 3 | Modalités du transfert différé..... | 20 |
| 4 | Congélation / décongélation des embryons | 20 |
| 5 | Analyse statistique | 22 |
| 5.1 | Appariement | 22 |
| 5.2 | Critère de jugement principal | 22 |
| 5.3 | Critères de jugement secondaires | 23 |
| 5.4 | Statistiques..... | 23 |
| | Résultats | 24 |
| 1 | Description des groupes | 24 |
| 2 | Résultats des congélations/décongelations en transfert embryonnaire différé. | 25 |
| 3 | Taux de transfert embryonnaire | 27 |
| 4 | Analyse univariée..... | 27 |
| 4.1 | Analyse du critère de jugement principal | 27 |
| 4.2 | Analyse des critères de jugement secondaires..... | 28 |
| 4.3 | Analyse en sous-groupes | 29 |
| 5 | Analyse multivariée | 30 |
| | Discussion | 31 |
| | Conclusion | 37 |
| | Bibliographie | 38 |

Abréviations

ABM : Agence de la Biomédecine

AMH : Hormone anti Müllerienne

CJP : Critère de jugement principal

CJS : Critère de jugement secondaire

CP : Culture prolongée

FCS : Fausses couches spontanées

FIV : Fécondation *in vitro*

FSH : Follicule stimulating hormone

GC : Grossesse clinique

IC95% : Intervalle de confiance à 95%

IMC : Indice de masse corporelle

LH : Hormone lutéinisante

Nb : Nombre

OR : Odd ratio

PGS : Screening génétique pré-implantatoire

TEC : Transfert d'embryon congelé

Tx : Taux

Vs : Versus

La congélation embryonnaire est un outil « clef » en fécondation *in vitro* (FIV) dont les bénéfices potentiels sont encore à explorer. Depuis une trentaine d'année, la congélation des embryons surnuméraires a permis d'augmenter les taux de grossesse par tentative de FIV, tout en favorisant le remplacement d'un seul embryon pour limiter les grossesses multiples. La congélation de cohorte embryonnaire entière (transfert embryonnaire différé) a ensuite permis de préserver les chances de grossesse de tentatives pour lesquelles le résultat était fortement compromis sur un transfert frais : hyperstimulation, avance de phase lutéale, hydrosalpinx, problème endométriale... Aujourd'hui, environ un quart des naissances en FIV est issu d'un transfert d'embryon congelé.

Avec l'amélioration des techniques de congélation dont la vitrification, les résultats en transferts d'embryons congelés semblent atteindre les résultats en transfert d'embryons frais. Les possibilités se sont alors élargies et d'autres indications pour désynchroniser stimulation et transfert ont percées : échecs d'implantation répétés, endométriose, blastocystes à développement lent (J6)... Certaines équipes le proposent en systématique aujourd'hui, cependant aucun consensus n'est encore établi par manque d'études solides.

Le centre d'AMP de l'hôpital Cochin, pratique la congélation embryonnaire par vitrification systématique depuis 2012, et propose le transfert embryonnaire différé dans certaines indications. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet de ce transfert différé sur le résultat des tentatives de FIV comparé aux tentatives ayant des caractéristiques similaires et ayant bénéficiées d'un transfert d'embryon frais. Le but est aussi d'identifier les indications pour lesquelles un transfert différé pourrait apparaître particulièrement bénéfique.

Nous poserons, au préalable, la question des arguments scientifiques en faveur du transfert embryonnaire différé.

Introduction

1 Généralités

La fécondation *in vitro*, consiste à mettre en contact les gamètes mâles et femelles *in vitro* afin d'obtenir un embryon qui est ensuite replacé dans l'utérus pour s'implanter. Les chances de grossesse par embryon replacé étant limitées ($\approx 20\%$ par embryon), il est nécessaire de disposer d'un nombre suffisant d'embryons pour garantir au couple un résultat satisfaisant. Les résultats, en France, sont de l'ordre de 20% de naissance par tentative de FIV (Rapport ABM 2013). Pour cela, une stimulation de la folliculogénèse ovarienne par gonadotrophines exogènes est réalisée permettant le recueil d'en moyenne 7 à 8 ovocytes par cycle, 36 heures après le déclenchement de l'ovulation. Classiquement, 1 ou 2 des embryons obtenus sont ensuite replacés dans l'utérus 2 ou 3 jours après le recueil ovocytaire (au stade d'embryon clivé précoce) ou 5 à 6 jours après le recueil (au stade de blastocyste). L'intérêt d'attendre J5 ou J6 est de sélectionner un embryon qui aura évolué après activation du génome embryonnaire et de s'éloigner de la stimulation ovarienne source de contractions utérines. La congélation d'embryons surnuméraires (dans environ 25 à 30% des tentatives de FIV) est proposée au couple pour d'éventuels transferts ultérieurs d'embryons congelés (TEC), en cas d'absence de grossesse suite au transfert frais ou en cas de désir d'un deuxième enfant.

1.1 La congélation embryonnaire

La congélation embryonnaire dans l'azote liquide (-196°C) va arrêter tous les phénomènes biologiques et suspendre le temps cellulaire. A cette température, l'eau est à l'état solide. Afin que la cellule survive aux transitions de phase lors de la descente puis de la remontée en température, l'adjonction de cryoprotecteurs est indispensable. Ils vont permettre de protéger la cellule en abaissant la température de cristallisation et en déshydratant les cellules. Actuellement 2 techniques, pour la congélation embryonnaires, sont disponibles : la congélation lente, utilisée depuis une trentaine d'années et la vitrification, pratiquée depuis moins de 10 ans en France. Les 2 techniques utilisent les mêmes cryoprotecteurs ; seuls diffèrent les concentrations des molécules, leurs temps d'exposition et la vitesse de descente en température.

1.1.1 La congélation lente

La congélation lente vise un équilibre progressif entre les cryoprotecteurs et le compartiment aqueux des cellules. Le temps d'exposition aux cryoprotecteurs est relativement long avec des concentrations inférieures à 1,5 molaires. La descente en température est progressive sur une à deux heures et contrôlée par un appareil de descente en température jusqu'à -30°C . Un seeding est réalisé manuellement lorsque la température avoisine les -7°C pour induire la cristallisation de l'eau en limitant le phénomène de surfusion (réaction exothermique lors de la transition de phase qui peut engendrer des dégâts cellulaires). La décongélation sera en miroir, elle aussi, progressive.

1.1.2 La vitrification

La vitrification vise un passage direct de l'état liquide à l'état solide amorphe (dit vitreux) sans qu'aucun cristal de glace ne se forme. Le temps d'exposition aux cryoprotecteurs est court avec des fortes concentrations d'environ 7 molaires. La descente en température est très rapide par plongée directe de l'embryon, monté sur un support, dans l'azote liquide. Les dispositifs de stockage des embryons sont de deux types : le système fermé qui permet d'isoler l'embryon de l'azote liquide en enfermant le support embryonnaire dans des paillettes avant la plongée à -196°C ; le système ouvert pour lequel le support embryonnaire est directement mis en contact avec l'azote liquide. Le système fermé permet des descentes en température de l'ordre de 2500°C par minute contre $20\ 000^{\circ}\text{C}$ par minute en système ouvert. Lors de la dévitrification, la remontée en température est ultra rapide par plongée directe de l'embryon depuis l'azote liquide dans un milieu à 37°C .

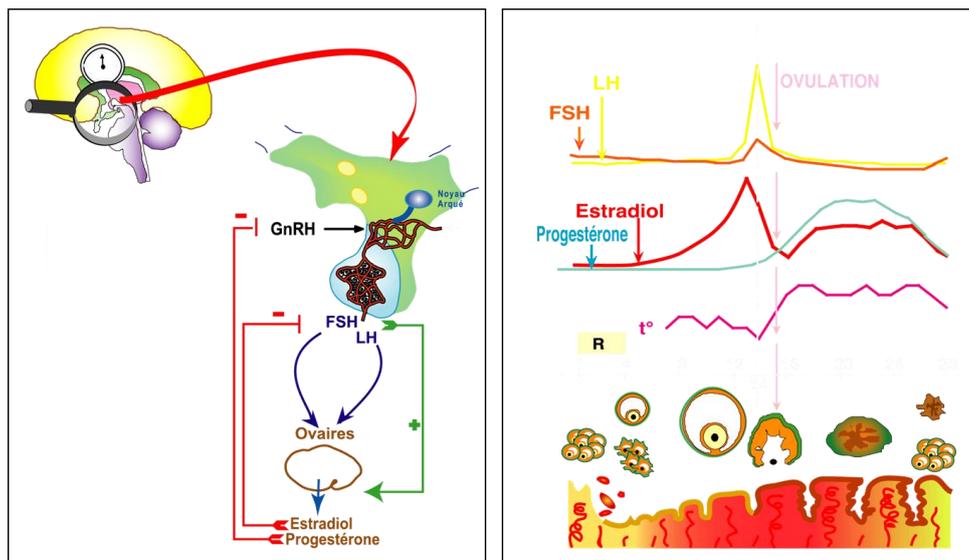
Dans les 2 techniques les embryons décongelés sont débarrassés des cryoprotecteurs par passage successifs en bains de concentrations décroissantes en cryoprotecteurs et rinçage. Leur survie peut être évaluée soit 2 heures après la décongélation en évaluant la vitalité sur l'aspect des cellules (figure 1) soit le lendemain sur la reprise des divisions cellulaires car les dégâts cellulaires ne sont pas toujours visibles immédiatement.

Le transfert de l'embryon décongelé sera réalisé sur un endomètre préalablement préparé à la fenêtre d'implantation.

1.2 Physiologie de l'endomètre et implantation

1.2.1 L'endomètre

L'endomètre est l'un des tissus les plus complexes de l'organisme avec son fonctionnement cyclique et sa fenêtre d'implantation réduite à 4 jours par cycle. Il s'agit d'un épithélium glandulaire prismatique uni stratifié. Physiologiquement, l'endomètre subit des modifications morphologiques et fonctionnelles sous l'influence des taux d'estrogène et de progestérone qui varient au cours du cycle ovulatoire. Cette sécrétion hormonale est le témoin de l'intégrité de l'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien. On identifie une phase proliférative, les 14 premiers jours du cycle, avec augmentation du volume de la muqueuse endométriale sous l'action mitotique des estrogènes sécrétés par les cellules de la granulosa des follicules ovariens. Après l'ovulation, l'endomètre entre en phase sécrétoire sous l'influence de la progestérone sécrétée par le corps jaune : les glandes deviennent sécrétoires avec une décidualisation du stroma.



La fenêtre d'implantation se situe en phase sécrétoire intermédiaire, J20-J23 d'un cycle de 28 jours, et est caractérisé par la présence de pinopodes (fines projections membranaires) et de glycoprotéine de type lectines à leur surface. L'apparition des pinopodes est régulée par la progestérone et corrélée à la disparition des récepteurs à la progestérone. Cette période est aussi marquée par une forte infiltration de cellules NK, équilibre immunologique sensible indispensable à cette greffe semi allogénique qu'est la grossesse. Physiologiquement, l'embryon arrive dans la cavité utérine au stade de morula, environ 4 jours après que la fécondation ait eu lieu dans la trompe. L'embryon évolue ensuite en blastocyste qui éclot (sortie de la zone pellucide) au 5^{ème}-6^{ème} jour post-fécondation et s'implante dans la muqueuse utérine.

1.2.2 L'implantation

L'implantation commence entre le pôle embryonnaire du blastocyste et les pinopodes des cellules endométriales. Elle nécessite une interaction complexe, en cascade, entre les cellules trophoblastiques et les cellules épithéliales. Elle débute par une phase d'apposition du blastocyste puis un processus d'invasion et d'enfouissement de l'embryon. Cette interaction en cascade entre les 2 épithéliums fait intervenir des facteurs de croissance (CSF, EGF, VEGF), des intégrines, des cytokines (IL1, LIF), des adipokines et les hormones (estrogène et progestérone). Elle n'est possible que lorsque l'endomètre est en fenêtre d'implantation. Grâce à une activité enzymatique protéolytique contrôlée, le trophoblaste va envahir la matrice extra cellulaire de l'endomètre décidualisé. L'embryon va pouvoir ensuite établir des relations complexes avec la circulation maternelle dès le 9^{ème} jour de développement : c'est le début de la placentation. La qualité de cette placentation va retentir sur le développement fœtal futur. Une invasion insuffisante va être responsable de retard de croissance in utero (RCIU) et d'hypertension artérielle (HTA) gravidique voir de préclampsie alors qu'un excès d'invasion donnera un placenta accreta ou des moles hydatiformes.

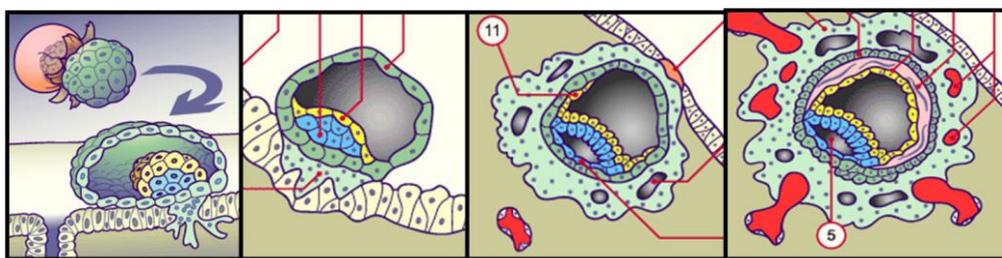


Figure 2 - Eclosion et implantation : Invasion, enfouissement et début de la circulation utéro placentaire. (C. Bergeron, EMC)

2 Fondements du transfert différé

Une naissance en FIV est obtenue par l'association de 3 facteurs clefs qui sont : (i) un embryon évolutif, (ii) un endomètre de qualité et (iii) une synchronisation entre ces 2 derniers. Depuis les débuts de la FIV beaucoup d'efforts de recherche se sont centrés sur le moyen de sélectionner un embryon évolutif et certaines équipes vont jusqu'au PGS (Screening Génétique Pré-implantatoire) pour choisir un embryon euploïde à transférer (1)(2). Mais malgré ces progrès pour sélectionner les embryons, l'implantation échoue dans plus de la moitié des cas. Le transfert différé se propose d'agir sur les 2 autres clefs de la réussite : l'endomètre et la synchronisation embryon/endomètre. Pour cela, il est proposé aux couples de désynchroniser le recueil ovocytaire et le transfert embryonnaire. Tous les embryons sont alors congelés pour réaliser le transfert sur un cycle ultérieur à distance de la stimulation ovarienne. Cette nouvelle approche doit en grande partie sa place au progrès de la congélation embryonnaire.

2.1 La congélation embryonnaire aujourd'hui

Aujourd'hui, les embryons peuvent être efficacement cryoconservés à tous les stades de développement (zygotes, embryon clivé ou blastocyste).

Il n'existe, à ce jour, aucune étude randomisée évaluant le stade embryonnaire le mieux adapté à la congélation. Chaque centre a fait son expérience et établi ses pratiques qui ne sont pas forcément extensibles à d'autres équipes. Les résultats sont, ainsi, difficilement comparables entre les centres car ils sont fonction du stade embryonnaire à la congélation, du type de cohorte embryonnaire (totale ou surnuméraire), de la qualité des embryons congelés, de la technique utilisée (technique lente ou rapide ; système de stockage ouvert ou fermé), de la préparation de l'endomètre (naturelle ou artificielle) et de la façon d'exposer les résultats (définition de la survie embryonnaire après décongélation, définition de la grossesse par transfert ou par cycle de décongélation).

Ainsi, il est difficile de dire aujourd'hui quelle est la meilleure technique de congélation. Les méta-analyses de Loutradi *et al.*, de Kolibianaki *et al.* et de Abdelhafez *et al.* qui comparent la congélation lente et la vitrification ont rapidement conclu à la supériorité de la vitrification pour tous les stades embryonnaires(3)(4)(5). Cependant, devant le nombre restreint d'études incluses et leurs méthodologies critiquables ou obscures (effectifs restreints, absence ou pseudo randomisation, variabilité de l'expression des résultats), leurs conclusions ne devraient pas être retenues. A l'inverse, 2 études randomisées, publiées après ces méta-analyses, n'ont pas pu mettre en évidence de supériorité de la vitrification au stade d'embryon clivé en termes de taux de survie et de taux de grossesse (6)(7). Si la littérature ne peut finalement pas conclure clairement, les centres français ont évalué chez eux, quelle technique donnait les meilleurs résultats dans leurs conditions. Ainsi, beaucoup de centres se tournent actuellement vers la vitrification notamment pour la congélation des blastocystes mais aussi de plus en plus

pour les autres stades embryonnaires (Journée des Techniciens et des Biologistes, Blefco 2013).

Aujourd'hui, Cobo *et al.* présente des résultats enviables avec des taux de survie de 95% et des taux de naissance de 38% après vitrification des embryons au stade clivé et au stade blastocyste (8).

L'un des réelles bénéfices de la vitrification pourrait être une meilleure préservation du potentiel développemental des ovocytes et des embryons (9). Cela est probablement lié à la quasi absence de cristaux de glace dans les cellules et aux moindres concentrations intracellulaires des cryoprotecteurs potentiellement cytotoxiques avec la technique de vitrification comparé à la congélation lente (10). Il est intéressant de noter que la double vitrification (ovocytes puis embryons) n'altère pas les résultats (11)(9).

Aujourd'hui plusieurs équipes retrouvent des résultats aussi bons en TEC qu'en transfert embryonnaire frais voir meilleurs. Les résultats les plus intéressants sont ceux de B. Shapiro, qui a comparé le transfert unique de blastocystes frais et congelés issus de cohortes embryonnaires entières (12). Le taux de grossesse était pour les blastocystes à J5 de 61% après congélation et de 56,5% en frais. La force de cette étude est d'avoir apparié les groupes sur la qualité des blastocystes. Mais il faut bien noter que l'auteur choisit une stratégie peu classique : la congélation lente de tous les zygotes à J1 suivit d'une culture prolongée post décongélation. Ceci lui permettrait de ne transférer que des embryons évolutifs, indemnes de la congélation, et donc d'avoir de très bon taux d'implantation.

Quel que soit le mode de congélation, si celui-ci est performant, il offre la possibilité de replacer un embryon dans un milieu plus naturel, loin de la tempête hormonale de la stimulation et de ces effets potentiellement délétères sur l'endomètre et le myomètre.

2.2 Effet de la stimulation sur l'endomètre

Après stimulation ovarienne, l'hyper ovulation est responsable d'une hyper estrogénémie et hyper progestéronémie non physiologiques. Cela n'est pas sans conséquence sur la muqueuse endométriale. Il a été mis en évidence : i) des perturbations histologiques avec une avance d'apparition des pinopodes (13), ii) une avance de disparition des récepteurs à la progestérone (14), iii) des modifications immunologiques (15), iiiii) des modifications du profil d'expression génétique (16)(17). L'endomètre est donc perturbé après stimulation ovarienne avec une avance d'environ 1 à 2 jours comparé à l'endomètre physiologique (18)(19). Certaines équipes retrouvent une altération plus marquée du profil d'expression génétique avec les protocoles de stimulation utilisant des agonistes du Gn-RH qu'avec les protocoles utilisant des antagonistes (16). Plus la stimulation est intense, plus l'endomètre est perturbé. Il est décrit une absence d'implantation totale lorsque que l'endomètre présente une avance de 3 jours (20). On imagine aisément que cette avance dans la fenêtre d'implantation peut être particulièrement défavorable pour des embryons plus lents. Hors, les conditions de culture *in vitro* sont peut être responsables d'un développement embryonnaire plus lent comparée aux conditions naturelles. La désynchronisation embryon / endomètre est probablement responsable d'une partie des échecs d'implantation en FIV.

2.3 La synchronisation embryon/endomètre

Lors d'un transfert d'embryon frais post ponction, il existe une corrélation positive entre la vitesse de développement du blastocyste et son implantation (J5>>J6) et une corrélation négative avec la progestéronémie au déclenchement. Ainsi les facteurs prédictifs d'une grossesse en FIV sont : un embryon de développement rapide associé à un endomètre peu avancé (21).

Lors d'un don d'ovocytes frais, donc lors du transfert d'un embryon frais sur une muqueuse non stimulée, ces corrélations disparaissent. Les résultats entre transfert à J5 et à J6 sont comparables (22) et la progestéronémie haute au déclenchement de la donneuse pourrait même avoir un rôle positif sur les résultats (23)(24). Il en est de même lors des transferts d'embryons congelés : il n'y a plus de corrélation entre l'implantation et le jour de congélation, J5=J6 (22)(12)(25)(26)(1), ni entre l'implantation et la progestéronémie au déclenchement. De plus, lors d'un partage d'ovocytes d'une même ponction entre 2 patientes (la donneuse d'ovocytes et la receveuse), les taux de grossesse semblent moins bons chez la donneuse exposée à la stimulation ovarienne que chez la receveuse dont l'endomètre n'a pas été exposé (27).

Entre ces différents schémas observés, frais/don/congelé, c'est l'exposition, ou non, de l'endomètre à la stimulation ovarienne qui semble modifier les résultats. L'embryon J6 ne serait pas un embryon moins évolutif mais son échec d'implantation serait lié à sa désynchronisation avec l'endomètre post stimulation ovarienne. D'ailleurs l'équipe de Capalbo *et al.* retrouve des taux d'aneuploïdie équivalents entre J5 et J6, ne pouvant pas expliquer les échecs d'implantation lors d'un transfert frais (1).

Le fait de différer le transfert embryonnaire sur une muqueuse non stimulée pourrait donc améliorer les résultats notamment dans les cas à risque de désynchronisation : progestéronémie élevée (>1ng/ml) (28) et embryon à développement lent (J6)(29). Mais dans tous les cas, différer le transfert permet une implantation dans une muqueuse non stimulée et donc probablement une meilleure placentation, élément indispensable pour l'issue obstétricale.

2.4 Issues obstétricales en FIV

Le premier enfant né après FIV a aujourd'hui 36 ans, le premier né après un TEC a 30 ans et le premier né après transfert d'un embryon vitrifié a 14 ans. Aujourd'hui plus de 4 millions d'enfants sont nés par assistance médicale à la procréation et pourtant les interrogations sur les risques à court et long termes persistent. Malgré les difficultés méthodologiques, de grandes études menées par nos collègues nordiques, ont pu nous rassurer sur la santé des enfants nés par FIV. La principale crainte des anomalies congénitales est modérée puisque l'on retrouve une incidence d'environ 4.5% contre 3% dans la population générale, soit un risque relatif allant de 1.3 à 1.7 dans les différentes études (30)(31). Ces anomalies congénitales semblent surtout affecter le système urogénital. A noter que cette augmentation se retrouve aussi en insémination intra utérine et qu'elle correspondrait au risque de la population générale avec un délai nécessaire pour concevoir (DNC) supérieur à 12 mois en conception naturelle (32). La part de l'infertilité parentale ou des techniques d'AMP est donc difficile à évaluer. Quoiqu'il en soit, la congélation des embryons n'augmente pas ce risque d'anomalies congénitales (30). Par contre, il est maintenant établi que les enfants nés par FIV ont un poids de naissance plus bas, et que le risque de prématurité, de césarienne en urgence et de mortalité périnatale est plus élevé (33)(34)(31). Ces retards de croissance sont, pour la majorité, in utero et l'enfant rattrape son retard après la naissance contrairement à un retard de croissance d'origine constitutionnel. Des études récentes ont pu montrer des poids de naissance plus élevés avec moins de prématurité chez les enfants nés après un TEC comparé à ceux nés après un transfert frais incriminant ainsi l'altération endométriale par les protocoles de stimulation qui serait responsable de trouble de la placentation (30)(35)(36). Une étude a pu mettre en évidence un risque diminué de pré éclampsie en TEC comparé au transfert frais lors d'hyperstimulation (37) mais une autre retrouve aussi un sur-risque de mal placentation en TEC avec plus d'HTA d'origine placentaire et de placenta accreta (38). De plus, plusieurs

de ces études retrouvent une augmentation des enfants nés post terme ainsi qu'un risque accru de macrosomie avec toutes les complications périnatales qui en résultent (39)(38)(40). D'autres études seront nécessaires pour affirmer ce risque car les études actuelles ne prennent pas toujours en compte certains facteurs confondants tels que l'indice de masse corporelle maternel (IMC), la parité, le rang de la demande ou l'existence d'un diabète gestationnel. De façon beaucoup moins consensuelle, certaines équipes décrivent un risque de grossesses ectopiques plus bas (41), certains décrivent une diminution du taux de FCS après transfert d'embryons congelés (42) alors que d'autre retrouve un taux de FCS augmenté (43). En conclusion, la santé des enfants nés après TEC est rassurante et le fait de différer le transfert pourrait globalement améliorer les issues obstétricales (44).

2.5 Les études comparatives « transfert frais/transfert différé »

Il existe 2 études randomisées évaluant l'effet du « freeze all » ayant donné lieu à la méta analyse de Roque *et al.* en 2013 (45). Cependant l'étude d'Aflatoonian *et al.* a été retirée pour des raisons méthodologiques (46). Il n'est donc plus possible de tenir compte de ses résultats. Demeure l'étude de Shapiro *et al.*, publiée en 2011, qui rapporte la supériorité de la stratégie « freeze-all » sur le transfert frais avec des taux d'implantation de 63% et 37% respectivement chez des patientes normo répondeuses prises en charge pour une première tentative (53 transferts frais contre 50 transferts différés), $p < 0.0001$ (47). A noter que, cette équipe congèle tous les embryons au stade zygote puis effectue une culture prolongée post décongélation pour un transfert au stade blastocyste. La technique de congélation utilisée était la congélation lente avec des taux de survie communiqués de l'ordre de 90%. D'après les auteurs, le potentiel développemental des zygotes est altéré par la congélation lente, avec en moyenne 0.7 ± 1.4 blastocystes obtenu après réchauffement contre $1,8 \pm 2.3$ blastocyste en frais, $p = 0.0034$. Cependant, malgré ces pertes, les résultats demeurent tout de même meilleurs dans

le groupe « transfert différé ». La même équipe, avec la même stratégie de congélation, a aussi montré au travers d'une étude rétrospective, la supériorité du transfert différé après au moins un échec d'implantation (27% contre 46% de taux cumulés de naissance) (48).

D'autres études randomisées enregistrées sont en cours et très attendu (NCT00823121, NCT01841528, NTR3187 sur <https://clinicaltrials.gov/>).

Ainsi les arguments sont là : de bons résultats en transfert d'embryon congelé avec potentiellement de meilleures issues obstétricales. Cependant les études comparatives solides manquent et pour le moment aucun consensus n'existe sur les indications du transfert différé.

Le centre d'AMP de Cochin propose aux couples qu'il prend en charge une désynchronisation entre la stimulation ovarienne contrôlée et le transfert des embryons dans 2 situations :

- De manière anticipée, après 2 échecs d'implantation.
- De manière tardive, en cours de stimulation, face à un risque d'hyperstimulation ovarienne ou tout évènement intercurrent compromettant les chances de grossesse.

Nous nous proposons, dans cette étude, de mener une analyse comparative cas / témoins des tentatives d'AMP avec transfert embryonnaire frais ou différé réalisées dans le centre entre janvier 2013 et mai 2014. Ceci permettra d'apporter des informations sur : (i) l'impact de la congélation de cohortes embryonnaires entières sur les chances de grossesse et (ii) les indications du « freeze all »

Matériels et méthodes

Nous avons réalisé une étude comparative rétrospective analysant les tentatives de FIV avec transfert embryonnaire frais ou différé réalisées entre janvier 2013 et mai 2014 dans le centre d'AMP de l'hôpital Cochin à Paris.

1 Population

Les indications du transfert embryonnaire différé au moment de l'étude étaient:

- Tentative après au moins 2 échecs d'implantation.
- Risque d'hyperstimulation ovarienne : estradiolémie ≥ 3000 pg/ml ou plus de 15 follicules ≥ 15 mm au moment du déclenchement.
- Evénements péjoratif survenant en cours de stimulation : hydrosalpinx, endomètre trop fin ou anormal (< 7 mm, polype...), lame liquidienne intra utérine, métrorragies.

Au moment de l'analyse des données, 448 tentatives avec transfert différé avaient été réalisées sur la période étudiée. Quarante-trois patientes n'avaient pas encore réalisé leur 1^{er} transfert embryonnaire alors que des embryons avaient été congelés. Sur les 355 tentatives restantes, 115 présentaient trop de données manquantes sur les variables à analyser lors de l'extraction des données du logiciel Médifirst® pour être incluses dans l'analyse statistique multivariée. Après vérification, les caractéristiques de ces 115 tentatives ne différaient pas de celles des autres tentatives de transfert différé en termes d'âge moyen des femmes et de taux de grossesse. Nous avons donc fait le choix d'exclure de l'analyse comparative ces 115

tentatives. Au final, sur les 240 tentatives avec transfert embryonnaire différé retenues, 231 tentatives ont pu être appariées à 231 tentatives similaires avec transfert embryonnaire frais. Les annulations de transfert pour absence d'embryon transférable dans les 2 groupes ont été incluses dans l'analyse.

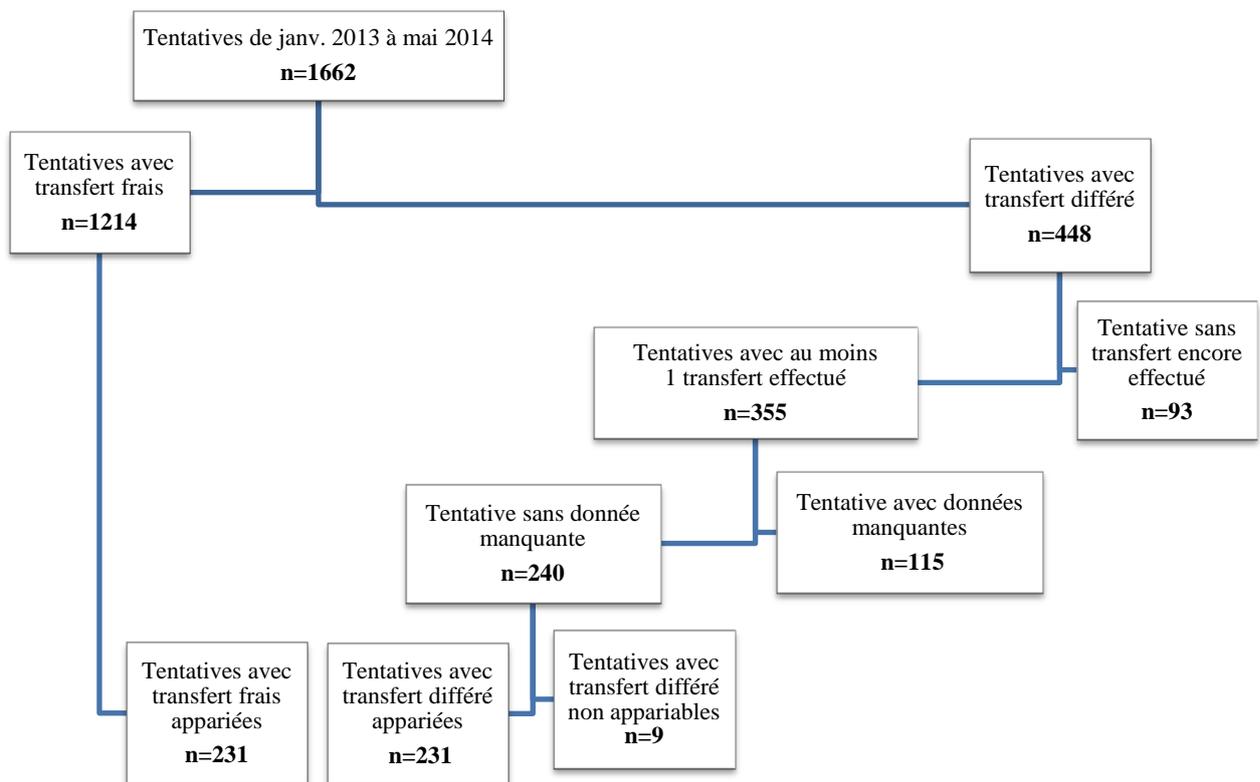


Figure 3 - Diagramme des flux de population

2 Protocole de FIV

2.1 Stimulation

Les paramètres du bilan féminin déterminaient le choix du protocole de stimulation ovarienne qui était de 3 sortes. (i) Le protocole agoniste standard : blocage de l'axe hypothalamo-hypophysaire par agoniste de la GnRH (Décapetyl®, Ipsen, France) puis début de la stimulation ovarienne 2 semaines après le blocage. (ii) Le protocole Micro Flare : agoniste de la GnRH débuté 2 jours avant la stimulation ovarienne. (iii) Le protocole antagoniste : stimulation ovarienne à partir de J2 puis début d'un antagoniste de la GnRH (Cetrotide®, Serono, France) à J6. Dans tous les cas, la stimulation ovarienne était réalisée par injection quotidienne de FSH recombinante (Gonal-F®, Serono, France ou Ménopure®, Ferring, France) dont les quantités étaient adaptées en fonction de la réponse ovarienne (monitoring échographique et estradiolémie). Le déclenchement de l'ovulation était réalisé par hCG recombinante (Ovitrelle®, Serono, France) ou par agoniste du Gn-RH lorsque qu'au moins 3 follicules dépassaient 15mm associés à une estradiolémie supérieure à 1000pg/ml. Le recueil ovocytaire était effectué 36 heures après le déclenchement. Un soutien de la phase lutéale par progestérone intra vaginale (Estima® ou Progestan®) était débuté dès le soir de la ponction et poursuivi à la dose de 3 ovules/jour jusqu'au dosage de la β -hCG plasmatique 12 jours après le transfert.

2.2 Mise en fécondation et culture embryonnaire

En fonction des paramètres spermatiques, la mise en fécondation était réalisée par FIV classique ou avec micro injection dans les 3 à 5 heures suivant le recueil ovocytaire. La fécondation était attestée 16 à 18h après l'insémination par l'observation de 2 pronuclei et de 2 globules polaires (= zygote). La culture embryonnaire était réalisée en gouttes de 25 μ l de

milieu de culture Global® (LifeGlobal, JCD, France) sous huile minérale. Les embryons étaient évalués à J2 pour le transfert d'1 ou 2 embryon(s) tandis que les embryons surnuméraires étaient placés en culture prolongée (CP) en goutte de 50 µl de milieu sous huile. A J2, la qualité embryonnaire était appréciée selon la classification suivante: nombre de cellules, clivage typique/atypique, volume occupé par les fragments cytoplasmiques : type A (<10%), B (10-30%), C (30-50%), D (>50%). La classification de Gardner et Schoolcraft était utilisée au stade de blastocyste à J5 et J6 (49). Elle est présentée dans la figure 4. Seuls les blastocystes ayant atteint une expansion stade 3 et présentant au moins une masse cellulaire interne ou un trophoctoderme ayant atteint le grade B (>B3 IC TC) étaient cryoconservés.

Grade 1: Blastocyste précoce (blastocèle < 50% du volume)
Grade 2: Blastocyste (blastocèle ≥ 50% du volume)
Grade 3: Blastocyste complet (blastocèle remplissant la totalité du volume)
Grade 4: Blastocyste expansé (ZP amincie)
Grade 5: Blastocyste en éclosion (Hernie du trophoctoderme au travers de la ZP)
Grade 6: Blastocyste éclos

Pour les blastocystes grade 3 à 6, évaluation de la masse cellulaire interne (MCI) et du trophoctoderme :

| | MCI : I | Trophoctoderme : T |
|----------|---|---|
| A | Beaucoup de cellules denses et groupées | Nombreuses cellules formant un épithélium cohésif (aspect festonné) |
| B | Plusieurs cellules espacées | Quelques cellules. Epithélium intermédiaire |
| C | Très peu de cellules | Très peu de cellules. Epithélium lâche (aspect lisse) |

Figure 4 - Classification de Gardner et Schoolcraft

2.3 Transfert

Les embryons étaient transférés à l'aide des cathéters suivants : Echogyn®, Frydman simple® ou Set TDT® (Irvine Scientific). Le transfert embryonnaire était réalisé sous échographie. Le dosage de la β -hCG plasmatique était réalisé 12 ou 14 jours après le transfert.

3 Modalités du transfert différé

En cas de transfert différé, aucun embryon frais n'était transféré. Les embryons étaient congelés soit tous au stade zygote soit, après une culture prolongée (CP), au stade blastocyste. Le choix se faisait en fonction du nombre de zygotes obtenus à J1 et de l'indication du transfert différé. En effet, le seuil pour effectuer une CP était fixé à 7 zygotes (\geq) en cas d'échec d'implantation et à 5 zygotes (\geq) dans les autres indications. Après CP, seuls les blastocystes de qualité suffisante étaient vitrifiés à J5 ou à J6 (> B3 IC TC).

4 Congélation / décongélation des embryons

La congélation/décongélation des embryons était assurée en système fermé à l'aide des kits VitFreeze kit® et VitWarm kit® (Irvine Scientific) et des paillettes haute sécurité (CBS®). Les zygotes étaient montés par 2, dans 2 gouttes distinctes, sur le dispositif CBS® (gouttière) avant d'être scellé dans la paillette et plongés dans l'azote liquide (Figure 5). Les blastocystes étaient, eux, montés individuellement.

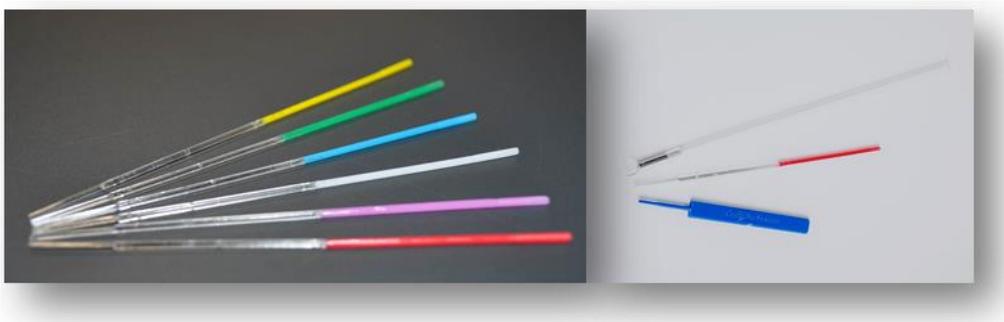


Figure 5 - Dispositif et paillettes CryoBioSytem CBS®

Les zygotes étaient tous dévitrifiés la veille du transfert pour un transfert de 1 ou 2 embryons à J2. Les embryons surnuméraires étaient placés en CP et les blastocystes obtenus étaient vitrifiés si la qualité le permettait (Voir classification). Les blastocystes eux, étaient dévitrifiés le jour du transfert pour un transfert d'un seul embryon. La survie des zygotes ou des blastocystes (Figure 6) était observée immédiatement après la décongélation et également juste avant le transfert pour les blastocystes afin d'évaluer le niveau de ré-expansion de la cavité blastocélique.



Figure 6 - Evaluation de la survie

A: zygote ayant survécu ; B: zygote atrétique ; C: blastocyste ayant survécu ; D: blastocyste atrétique

Les transferts d'embryons congelés étaient programmés sur des cycles substitués en estradiol (Provames®) pour un endomètre supérieur à 7mm suivi d'une substitution en progestérone intra vaginale (Progestan®, 3 ovules par jour) débutant 4 jours avant le transfert d'un

embryon J2 et 5 jours avant le transfert d'un blastocyste (J5, J6) et poursuivie pendant 3 mois en cas de grossesse.

5 Analyse statistique

5.1 Appariement

Les tentatives ont été appariées sur les caractéristiques féminines suivantes : nombre de zygotes obtenu, âge, IMC, FSH et AMH ainsi que sur le rang de la tentative : ceci afin de limiter les biais liés au caractère rétrospectif de cette étude. L'appariement a été réalisé via la méthode de « recherche du plus proche voisin ». Un calcul de distance Euclidienne a été utilisé sur les données centrées réduites (âge, IMC, FSH, AMH, nombre de zygotes) afin d'estimer la similarité entre les témoins et le groupe d'étude. Une distance maximale de 3 était autorisée dans l'appariement sur le nombre de zygotes. L'appariement sur le rang de la tentative a été réalisé si les 2 tentatives étaient de rang inférieur ou égal à 2 ou si leur rang était supérieur ou égal à 3.

5.2 Critère de jugement principal

Le critère de jugement principal (CJP) était le taux de grossesse clinique (GC) par tentative sur le 1^{er} transfert (nb de GC en incluant seulement le 1^{er} transfert/231 tentatives). La grossesse clinique était définie par la présence d'un sac embryonnaire intra utérin avec activité cardiaque à l'échographie 5 semaines après le transfert.

5.3 Critères de jugement secondaires

Les critères de jugement secondaires (CJS) étaient le taux de grossesse clinique par transfert, (nb de GC / nb de transfert), le taux d'implantation (nb de sacs / nb d'embryons transférés), le taux cumulé de grossesse par tentative (nb de GC en incluant tous les transferts / 156 tentatives achevées) et le taux de fausse couche spontanée (FCS) (nb de FCS / nb de GC). Les FCS correspondent aux interruptions spontanées de grossesses cliniques. Les fausses couches biochimiques étaient considérées comme des grossesses négatives.

5.4 Statistiques

La comparaison des variables qualitatives a été réalisée par un test du Chi² pour variables appariées (Mc Némard). Lorsque les variables étaient quantitatives, un test de Student pour variables appariées a été utilisé. Les différences observées étaient considérées comme significatives pour un $p < 0,05$.

Une analyse en sous-groupes a été réalisée selon l'indication du transfert différé (Echec d'implantation ou risque d'hyperstimulation) et pour les tentatives ayant reçus des doses totales de gonadotrophines importantes ($\geq 2500\text{UI}$).

Une analyse multivariée par régression logistique pour prendre en compte les facteurs confondants a été réalisée avec les facteurs influençant significativement le CJP : l'âge, l'IMC, l'AMH, le rang de la tentative, le nombre de zygotes obtenus, la dose totale de gonadotrophines reçue et le protocole de stimulation. Le logiciel « R » a été utilisé pour les analyses statistiques.

Résultats

1 Description des groupes

Les caractéristiques générales des 2 groupes sont résumées dans le tableau 1. L'appariement a permis de constituer 2 groupes comparables en termes d'âge, d'IMC et de rang de tentative dont les différences étaient non significatives. Par contre, une différence statistiquement significative a été observée sur l'AMH et sur le nombre de zygotes qui étaient tous les 2, plus élevés dans le groupe transfert différé (4,6 vs 4,0 pour l'AMH, $p < 0,001$ et 5,9 vs 5,5 pour le nombre de zygotes, $p < 0,001$). Ceci s'explique sans doute par le biais d'éligibilité des patientes au transfert différé pour risque d'hyperstimulation. En effet, ces patientes présentent une réserve ovarienne et un recrutement ovocytaire plus importants que les patientes du groupe témoin. L'impact de ces paramètres sur le critère de jugement principal sera pris en compte dans l'analyse multivariée.

Les principales indications du transfert différé étaient un antécédent de 2 tentatives avec échec d'implantation (35%) et le risque d'hyperstimulation ovarienne (33%). Les autres indications moins fréquentes ont été regroupées (32%) : l'augmentation de la progestérone avant déclenchement de l'ovulation, l'hydrosalpinx, l'épanchement intra utérin, les métrorragies en cours de stimulation ou les anomalies de la muqueuse (épaisseur, polype).

| | Tentatives en transfert frais | Tentatives en transfert différé | <i>p</i> |
|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------|
| Nombre | 231 | 231 | |
| Age de la femme | 34,9 ± 4,2 | 34,8 ± 4,5 | ns |
| BMI | 23,7 ± 3,6 | 23,6 ± 3,7 | ns |
| FSH à J3 | 7 ± 1,9 | 6,9 ± 2 | ns |
| LH à J3 | 53,2 ± 28,5 | 50,3 ± 25,7 | ns |
| Estradiol à J3 | 45,4 ± 31,2 | 45,3 ± 25,2 | ns |
| AMH (ng/ml) | 4 ± 2,8 | 4,6 ± 3,8 | <0,001 |
| CFA à J3 | 16,8 ± 9,4 | 17 ± 9,5 | ns |
| Rang de la tentative | 2,3 ± 1,4 | 2,2 ± 1,2 | ns |
| Protocole Agoniste (%) | 19 | 8 | <0,001 |
| Protocole Antagoniste (%) | 67 | 85 | <0,001 |
| Protocole MicroFlare (%) | 14 | 7 | <0,001 |
| Déclenchement par agoniste (%) | 1,3 | 77 | <0,001 |
| Durée de la stimulation (jours) | 9,7 ± 3,7 | 9,4 ± 1,4 | ns |
| Dose totale de gonadotrophines | 2481 ± 1042 | 2322 ± 836,7 | <0,001 |
| FIV avec ICSI (%) | 70 | 68 | ns |
| Nombre d'ovocytes recueillis | 9,4 ± 5 | 11,5 ± 6,9 | <0,001 |
| Nombre de 2PN à J1 | 5,5 ± 3,8 | 5,9 ± 4,3 | <0,001 |

Tableau 1 - Caractéristique générales des 2 groupes

2 Résultats des congélations/décongélations en transfert embryonnaire différé.

Sur les 231 tentatives réalisées en transfert différé, 109 ont bénéficié d'une culture prolongée ; ce qui a conduit à l'obtention de 546 blastocystes à partir des 817 zygotes concernés (taux de blastulation de 66,8%). Parmi les 546 blastocystes obtenus, 284 étaient éligibles à la vitrification (taux de blastulation utile de 34,8%) (Tableau 2). Vingt-trois tentatives sur les 109 (21,1%) ont présenté un échec de blastulation utile et donc une absence de congélation embryonnaire. Cent vingt-deux tentatives ont par ailleurs bénéficié d'une vitrification embryonnaire au stade zygote (415 zygotes vitrifiés).

| | |
|---|-----------------|
| Rendement de CP (nb de blastocyste/nb de zygotes) | 66,8% (546/817) |
| Rendement utile de CP (nb de blastocyste congelé/nb de zygotes) | 34,8% (284/817) |

Tableau 2 - Résultats de la mise en culture prolongée (CP)

Les résultats de la dévitrification embryonnaire sont présentés dans le Tableau 3. Les taux de survie étaient de 96,3% (389/404) et 93,5% (86/92) pour les zygotes et les blastocystes, respectivement. Seules 4 tentatives n'ont pas pu bénéficier de transfert embryonnaire après décongélation du fait de la lyse de la cohorte embryonnaire à la décongélation. Dans ces 4 cas, la congélation avait été réalisée au stade zygote.

Le taux d'implantation des blastocystes décongelés était de 47,7% et le taux d'implantation des embryons clivés issus de zygotes décongelés était de 16,6%.

| | Congélation au stade zygotes | Congélation au stade de blastocyste |
|---|------------------------------|--|
| Nb de tentatives avec transfert | 122 | 86 (74 à J5, 12 à J6) |
| Tx de survie (au 1er transfert) | 96,3% (389/404) | 93,5% (86/92) 93,7% à J5 92,3% à J6 |
| Tx d'implantation (au 1er transfert) | 16,6% (33/199) | 48% (41/86) 50% (41/86) à J5 33% (4/12) à J6 |

Tableau 3 - Résultats de la dévitrification embryonnaire

3 Taux de transfert embryonnaire

Les transferts embryonnaires de chaque groupe sont détaillés dans la figure 7. A la date de l'analyse, 204 tentatives du groupe transfert différé avaient pu bénéficier d'au moins un transfert d'embryon décongelé (118 transferts au stade d'embryon clivé et 86 au stade de blastocyste). L'absence de transfert pouvait être dû soit à une absence d'embryon à congeler au moment de la tentative (suite à un échec de fécondation ou à l'absence de blastocyste congelable à l'issue de la culture prolongée) soit à une absence d'embryon transférable après décongélation. Le taux de transfert effectif dans chacun des 2 groupes étaient 204/231 pour le groupe transfert différé et 218/231 pour le groupe transfert frais soit 90.0% vs 94.4% ($p=0,015$).

4 Analyse univariée

4.1 Analyse du critère de jugement principal

Le taux de grossesse par tentative a été calculé et comparé entre les 2 groupes. Aucune différence significative n'a été mise en évidence avec 30,7% de grossesse clinique (71/231) dans le groupe transfert différé et 36,4% dans groupe transfert frais, $p=0,21$ (tableau 4).

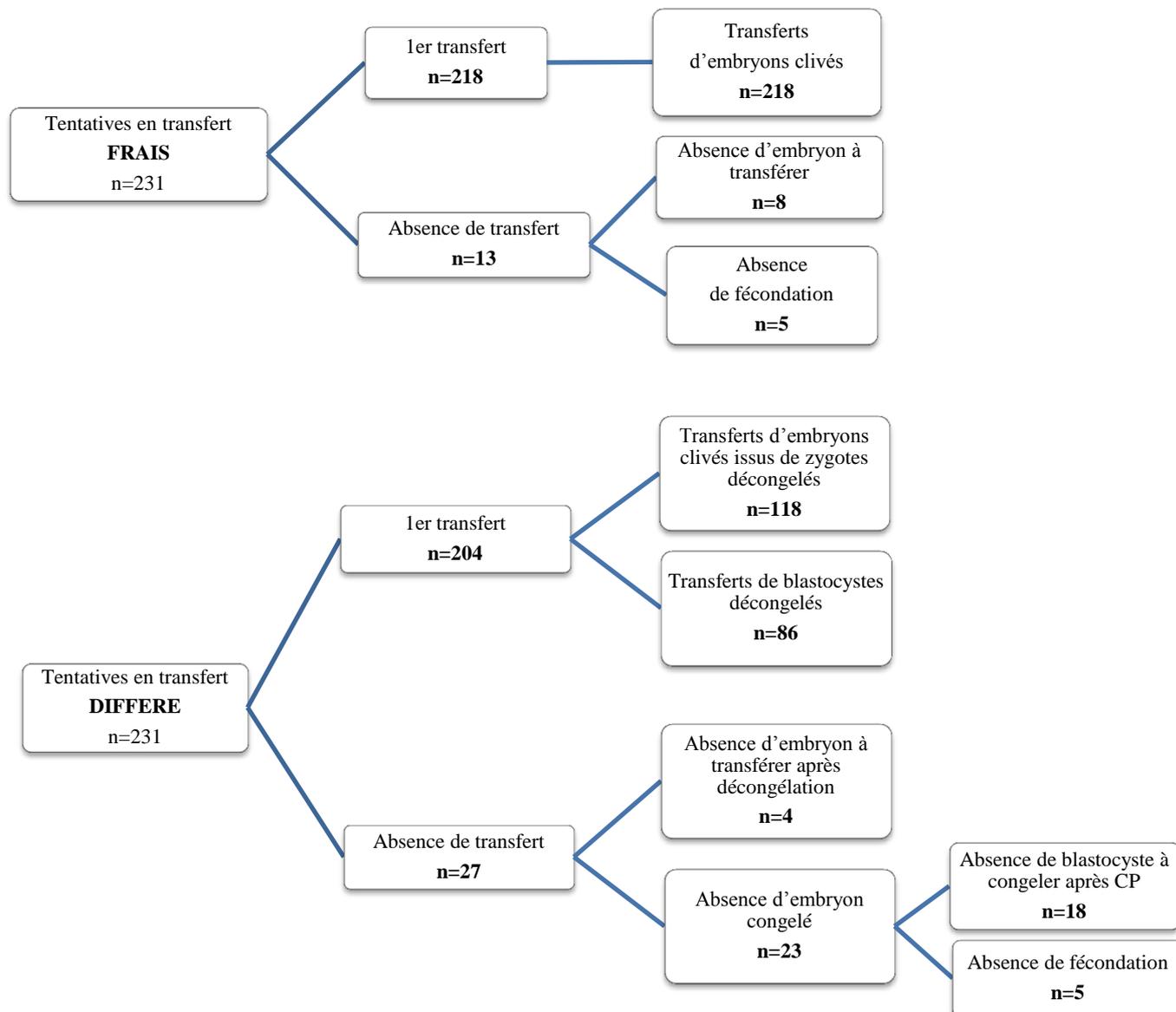


Figure 7 - Transferts embryonnaires

4.2 Analyse des critères de jugement secondaires

Les taux de grossesse par transfert étaient comparables entre les 2 groupes : soit 35% (71/203) et 38,5% (84/218) en transfert différé et transfert frais respectivement, $p=0,38$ (Tableau 4).

La différence entre les taux d'implantation des embryons clivés dans le groupe transfert frais et le groupe transfert différé était non significative : 20,5% contre 16,6% respectivement,

$p=0,34$ (Tableau 4). La comparaison n'a pas pu être menée pour les blastocyste car le centre ne pratique pas en routine le transfert de blastocystes frais.

Le taux de grossesse cumulé a pu être calculé pour 156 tentatives appariées et terminées. Soixante-quatre grossesses cliniques pour 156 tentatives en frais et 63 grossesses pour 156 tentatives en différé. Aucune différence significative n'a, donc, été observée entre les 2 groupes (64/156 soit 41,0% vs 63/156 soit 40,4% ; $p=1$) (Tableau 4).

Le taux de FCS était lui, par contre, beaucoup plus élevé dans le groupe transfert différé avec 29,6% (21/71) de FCS contre 9,5% (8/84) dans le groupe transfert frais, $p=0,003$ (Tableau 4).

4.3 Analyse en sous-groupes

Lorsque l'indication du transfert différé était un risque d'hyperstimulation ($n=76$), le taux de grossesse par tentative s'élevait à 42,1% (32/76) contre un taux de 44,7% (34/76) chez les témoins appariés, $p=0,9$ (Tableau 4). Il n'y a eu aucune hyperstimulation nécessitant une hospitalisation sur la période d'étude.

Lorsque l'indication du transfert différé était des échecs d'implantation répétés ($n=81$), le taux de grossesse par tentative était de 28,4% (23/81) contre 37,0% (30/81) chez les témoins appariés, $p=0,3$ (Tableau 4).

Pour les tentatives ayant reçus des fortes doses de gonadotrophines (≥ 2500 UI) ($n=65$), les taux de grossesse par tentatives était globalement plus bas et statistiquement comparables entre les 2 groupes : 18,5% (12/65) en transfert frais vs 21,5% (14/65) en transfert différé, $p=0,8$.

| | Groupe Transfert différé | Groupe Transfert frais | p |
|---|--------------------------|------------------------|--------|
| Tx de transfert | 90,0% | 94,4% | 0,0015 |
| Tx de GC par tentative | 30,7% | 36,4% | 0,21 |
| Tx de GC par transfert | 35,0% | 38,5% | 0,38 |
| Tx d'implantation des embryons clivés | 16,6% | 20,5% | 0,34 |
| Tx de GC cumulées par tentative | 40,3% | 41,0% | 1 |
| Tx de FCS | 29,6% | 9,5% | 0,003 |
| Tx de GC dans le groupe "risque d'HSO" | 42,1% | 44,7% | 0,9 |
| Tx de GC dans le groupe "échec d'implantation" | 28,4% | 37,0% | 0,3 |
| Tx de GC si dose de gonadotrophines recue \geq 2500UI | 21,5% | 18,5% | 0,8 |

Tableau 4 - Résultats des tests univariés

5 Analyse multivariée

Le modèle de régression logistique utilisé intégrait les paramètres pouvant influencer les chances de grossesses : l'âge, le rang de tentative, l'AMH, le nombre de zygotes obtenus, le type de protocole de stimulation et la dose totale de gonadotrophines reçue. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5. Après prise en compte de tous ces facteurs confondants, le transfert différé apparaît comme globalement défavorable pour l'obtention d'une grossesse avec un odd ratio à 0,59 (IC95% 0,48-0,74 ; p=0,02).

| Paramètres | Odds ratio (IC95%) | p |
|--|--------------------|-------|
| Transfert différé (vs transfert frais) | 0,59 (0,48-0,74) | 0,02 |
| Age (>37 ans) | 0,59 (0,46-0,74) | 0,03 |
| Rang (P1-P2) | 1,55 (1,22-1,98) | 0,07 |
| Nombre de zygote (>10) | 2,22 (1,59-3,10) | 0,02 |
| IMC (>25) | 1,09 (0,86-1,37) | 0,72 |
| AMH (>2ng/ml) | 1,02 (0,74-1,37) | 0,98 |
| Protocole de stimulation (agoniste) | 0,35 (0,25-0,50) | 0,004 |
| Dose totale de gonadotrophines (>2500UI) | 0,41 (0,28-0,61) | 0,02 |

Tableau 5 - Résultats en analyse multivariée

Discussion

L'impact du transfert embryonnaire différé a pu être évalué au travers de cette étude rétrospective de 231 tentatives cas/témoins appariées. Les taux de grossesse par tentative étaient similaires dans les deux groupes en analyse univariée (30,7% en différé et 36,4% en frais, $p=0,21$). Cependant la différence significative du nombre de zygotes, plus élevé dans le groupe « différé », rendait ces résultats difficilement interprétables. C'est pourquoi une régression logistique a été utilisée pour prendre en compte les facteurs confondants tels que le nombre de zygotes mais aussi l'âge, l'AMH, le rang de la tentative, le protocole de stimulation et la dose totale de gonadotrophines reçue. Les résultats de l'analyse multivariée montrent que le transfert embryonnaire différé est globalement défavorable à la survenue d'une grossesse sur une tentative avec un OR à 0,59 (IC95% 0,48-0,74 ; $p=0,02$).

Mais grâce à cette stratégie de prise en charge, aucune hospitalisation n'a eu lieu pour syndrome d'hyperstimulation durant la période d'étude à Cochin et le taux de grossesse par tentative pour les femmes à risque d'hyperstimulation s'élevait à 42,1% contre 44,7% pour les femmes présentant des caractéristiques similaires et ayant pu bénéficier d'un transfert frais. Cette différence n'était pas significative en analyse univariée ($p=0,9$).

Devant ces résultats, deux notions s'imposent à nous : (i) différer le transfert embryonnaire peut permettre d'éliminer les hyperstimulations ovariennes en FIV tout en maintenant des taux de grossesse très satisfaisants mais (ii) différer le transfert diminue les chances de grossesse par tentative. De plus, le fait de différer le transfert pourrait diminuer les taux de naissance car le risque de FCS est plus élevé après transfert d'embryon dévitrifié (29,5% vs

9,5%, $p=0,003$). La question de la cytotoxicité de la congélation est un sujet important. De nombreuses études s'y sont intéressées mais peu présentent un risque accru de FCS après congélation embryonnaire. Nos résultats concordent avec ceux d'Aflatoonian *et al.*, qui retrouve une augmentation des FCS en transfert d'embryon vitrifié (15% vs 9%, OR=1,44 IC95% 1,03-2,03) (46). Une étude récente retrouve aussi un taux plus élevé de FCS après vitrification d'ovocytes (30% vs 18%, $p<0,01$) (50) et deux équipes démontrent une altération de la méthylation de l'ADN après vitrification embryonnaire (51,52). Même si les groupes analysés ici sont peut-être des extrêmes en termes de FCS, la différence existe bien. En analysant les taux de FCS en transfert d'embryon frais et en transfert d'embryon vitrifié pour l'ensemble des tentatives à Cochin sur cette même période, on retrouve une différence significative de 12,2% (46/377) versus 20,3% (64/316) respectivement ($p=0,005$). Cela ne peut pas s'expliquer par une moins bonne qualité des embryons surnuméraires car dans notre étude la congélation concerne tous les embryons en première intention. Les conditions de culture prolongée ne semblent pas non plus être en cause puisque ces FCS se retrouvent aussi bien après congélation de zygote (8/21 FCS) que de blastocyste (13/21 FCS). A noter que le fait de congeler au stade zygote avec culture post décongélation avant transfert ne permet pas de sélectionner des embryons indemnes de tout dégât lié à la congélation comme le défendait l'équipe de B. Shapiro (47). En effet, cette équipe a toujours utilisé la stratégie de la congélation lente au stade zygote suivit d'une culture prolongée post décongélation. L'évolutivité post réchauffement serait le moyen de sélectionner, pour le transfert, un embryon indemne de tous dégâts cellulaires liés à la congélation. Dans leurs conditions, il semblerait que cela fonctionne puisque les auteurs présentent des résultats en taux de naissance vivante toujours supérieur en transfert différé sans décrire précisément leur taux de FCS. Dans notre centre, il faut envisager que la vitrification, même au stade zygote, puisse

être responsable d'altérations cellulaires qui se manifestent par une légère baisse des taux d'implantation des embryons clivés mais aussi, après l'implantation, par des FCS.

Ainsi, dans nos conditions actuelles, le taux de naissance ne sera pas amélioré par le transfert différé. Cependant, si les issues obstétricales sont réellement meilleures après transfert d'embryon congelé, avec plus de sécurité pour la mère et l'enfant, le taux de naissance vivante sans complication périnatale pourrait être amélioré. Cette partie n'a, hélas, pas pu être encore analysée à ce niveau de l'étude. Il sera en effet très intéressant d'évaluer ces issues obstétricales dans notre centre en prenant en compte les facteurs confondants qui ne sont pas intégrés dans la majorité des études publiées : l'âge, l'IMC, le diabète, la parité et la qualité embryonnaire. Il semblerait cependant que la qualité embryonnaire soit seulement liée aux chances d'implantation mais pas au devenir clinique après implantation comme le montre une récente étude canadienne (53). Cette étude pilote s'est intéressée au devenir clinique après transfert unique de milliers d'embryons. Si les chances de grossesse augmentaient significativement avec la qualité embryonnaire, il n'a pas été mis en évidence de lien entre morphologie et FCS ou complications périnatales.

L'état de l'art actuel ne nous permet pas de conclure sur le bénéfice réel du transfert différé ni en termes d'issues obstétricales, ni en terme de chance d'implantation. Dans ses études publiées, l'équipe de B. Shapiro, phare de cette stratégie, rapporte en première intention, un taux d'implantation embryonnaire globalement supérieur en différant le transfert embryonnaire (47). Mais lorsque qu'il analyse plus finement ses résultats, l'auteur rapporte des taux d'implantation d'embryon à J5 identiques entre les 2 groupes ; la supériorité du transfert différé se limitant au embryons transférés à J6 (12). Il faut souligner que la part du transfert à J6 est particulièrement élevée dans son centre, 46%, ce qui n'est pas le cas de la majorité des équipes pratiquant la culture prolongée. La proportion de blastocystes obtenu à J6 était de 15% dans notre centre. Les conditions de culture apparaissent comme un élément

déterminant dans le choix de la stratégie de prise en charge et l'intérêt de différer systématiquement le transfert des blastocystes obtenu à J6 devra être validé par une étude randomisée.

Un autre élément déterminant de toute stratégie est la stimulation ovarienne. Certaines équipes vont stimuler plus fort que d'autres et tireront peut être un meilleur avantage du transfert différé par rapport aux équipes pratiquant des stimulations plus douces et donc moins délétères pour l'endomètre. Cependant le transfert différé n'a pas montré de supériorité dans notre étude pour les tentatives ayant reçues de fortes doses de gonadotrophines (21,5% vs 18,5% en transfert frais, $p=0,8$). Ces cas doivent correspondre aux femmes « mauvaises répondeuses » pour lesquelles les qualités ovocytaires et embryonnaires sont probablement responsables des taux de grossesse abaissés, plus que l'effet délétère des fortes doses de gonadotrophines sur l'endomètre.

B. Shapiro a aussi mis en avant un bénéfice potentiel du transfert différé pour les cas d'échecs d'implantation dans une étude rétrospective avec un taux de naissance de 22% en frais contre 46% en transfert différé (48). Cependant sa définition d'échec d'implantation n'était pas très claire car cela concernait les tentatives dès le 2^{ème} transfert et des FCS pouvaient avoir eu lieu sur le 1^{er} transfert. De plus, il n'a pas intégré dans son analyse multivariée le jour du transfert des blastocystes (J5 ou J6) ni le nombre de zygotes qui était pourtant significativement supérieur dans son groupe « freeze all ». Dans notre centre, le transfert différé n'a pas prouvé sa supériorité pour les tentatives de rang supérieur ou égal à 3, considérées comme de moins bon pronostic que les tentatives de rang 1 et 2. Le taux de grossesse clinique semblait même plus bas dans le groupe transfert différé avec 28,4% (23/81) contre 37,0% (30/81) en transfert frais mais sans que cela ne soit statistiquement significatif ($p=0,3$). Dans certains cas d'échec lié à un problème de qualité embryonnaire, l'ajout de la congélation pourrait être plus délétère que le gain éventuel sur la réceptivité de l'endomètre en différant le transfert.

L'indiscutable difficulté du « freeze all » est le choix du stade et la sélection des embryons pour la congélation, notamment pour les tentatives où la qualité embryonnaire est problématique. En général, seuls les embryons jugés de qualité morphologique suffisante sont congelés. La qualité embryonnaire exigée pour la congélation est souvent supérieure à celle exigée pour le transfert d'embryon frais. Ainsi certains embryons qui auraient pu être transférés frais ne seront pas cryoconservés. Les limites de la morphologie sont pourtant bien connues et si un blastocyste d'aspect médiocre, a moins de chance de s'implanter qu'un blastocyste de morphologie optimale, il présente tout de même environ 20% de chance de s'implanter (49). Il est cependant certain que plus une équipe congèlera largement les cohortes embryonnaires, plus les résultats par transfert d'embryon congelé diminueront mais les résultats par tentative pourraient être améliorés. Ainsi, en plus de la perte embryonnaire potentielle liée à la technique de congélation en elle-même, une sur-sélection des embryons pour les tentatives en transfert différé entraînera potentiellement une perte de chance sur l'ensemble de la tentative. Le taux de transfert était significativement plus bas dans le groupe transfert différé (90% vs 94%, $p=0,002$) témoin de la perte embryonnaire dans cette stratégie. Cependant cet effet ne retentissait pas sur les taux de grossesse cumulés par tentative qui étaient comparables en analyse univariée (40% vs 41%, $p=1$). Une façon de limiter la sur sélection embryonnaire est de congeler les cohortes entières précocement au stade zygote. C'est une stratégie qui a été employée dans la majorité des cas à Cochin. Cependant, le fait de devoir recongeler les éventuels embryons surnuméraires et le surcoût financier et humain d'une telle organisation peut décourager certaines équipes. D'ailleurs ce surcoût ne se limite pas au laboratoire (congélation/décongélation, stockage) car le transfert différé c'est aussi, une prise en charge supplémentaire côté gynécologique pour préparer le TEC. En effet pour replacer l'embryon décongelé dans la fenêtre d'implantation endométriale, 3 procédures existent : (i) un cycle stimulé, (ii) un cycle substitué, ou (iii) un cycle spontané. S'il ne semble

pas exister de supériorité d'un protocole sur l'autre en termes de taux de naissance vivante (54) mais les couts eux décroissent respectivement et l'organisation du centre est grandement facilité par le cycle substitué. Des études randomisées intégrant toutes ces considérations sont en cours (NCT00492934, NCT01780558 et NTR1586). Ainsi, dans une stratégie où tous les transferts embryonnaires seraient différés sur cycle substitué, on pourrait imaginer ne plus faire de transfert le week-end.

Il faut aussi prendre en compte le fait qu'aucune disposition n'a, à l'heure actuelle, été prise concernant la prise en charge sociale de ces tentatives à transfert embryonnaire désynchronisé : le surcout incombera donc, à l'hôpital ou au patient. Si ce surcout est totalement contrebalancé par l'éviction d'une hospitalisation pour hyperstimulation ovarienne, il faudra pouvoir le défendre sérieusement dans les autres indications.

Ainsi, au vue de cette étude, le « freeze all » n'apparaît pas comme la solution pour améliorer les résultats en FIV dans notre centre mais comme un outil utile et efficace dans certaines indications. Le déclenchement par agoniste de la GnRH permettant d'éviter la quasi-totalité des syndromes d'hyperstimulation. D'autres pistes pour améliorer le versant endométrial de la réussite en FIV sont explorées. Par exemple, le concept de transfert embryonnaire « personnalisé » par réalisation d'un test de réceptivité endométrial est très intéressant. Une analyse transcriptomique de biopsie endométriale permettrait d'estimer précisément la fenêtre d'implantation propre à chaque patiente et donc de mieux synchroniser l'embryon et l'endomètre au moment du transfert (55)(56).

Conclusion

Cette étude rétrospective a permis d'évaluer l'intérêt du transfert embryonnaire différé dans notre centre. Le bénéfice est indiscutable pour les patientes à risque d'hyperstimulation ovarienne puisque cette stratégie permet d'éliminer totalement cette complication classique en FIV tout en gardant des taux de grossesse satisfaisants. Dans les autres indications, avec les conditions de culture qui sont propres à notre centre, nous n'avons pas pu mettre en évidence de supériorité de cette stratégie en termes de taux d'implantation. Le bénéfice éventuel fait sur la réceptivité endométriale semble contrebalancé par l'effet délétère de la congélation sur l'embryon. De plus, le taux de FCS étant plus élevé après vitrification, la véritable conclusion ne pourra se faire que sur les taux de naissance vivante. Actuellement, avec les résultats en vitrification embryonnaire de notre centre, le transfert différé doit être impératif lors d'un risque d'hyperstimulation mais d'autres pistes pour améliorer l'implantation embryonnaire et les issues obstétricales doivent être encore explorées (mild stimulation, test de réceptivité endométriale...).

Bibliographie

1. Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, et al. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum Reprod Oxf Engl.* juin 2014;29(6):1173-81.
2. Harper J, Geraedts J, Borry P, Cornel MC, Dondorp WJ, Gianaroli L, et al. Current issues in medically assisted reproduction and genetics in Europe: research, clinical practice, ethics, legal issues and policy. *Hum Reprod Oxf Engl.* août 2014;29(8):1603-9.
3. Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* juill 2008;90(1):186-93.
4. Kolibianakis EM, Venetis CA, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better? *Curr Opin Obstet Gynecol.* juin 2009;21(3):270-4.
5. AbdelHafez FF, Desai N, Abou-Setta AM, Falcone T, Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* févr 2010;20(2):209-22.
6. Wilding MG, Capobianco C, Montanaro N, Kabili G, Di Matteo L, Fusco E, et al. Human cleavage-stage embryo vitrification is comparable to slow-rate cryopreservation in cycles of assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet.* sept 2010;27(9-10):549-54.
7. Fasano G, Fontenelle N, Vannin A-S, Biramane J, Devreker F, Englert Y, et al. A randomized controlled trial comparing two vitrification methods versus slow-freezing for cryopreservation of human cleavage stage embryos. *J Assist Reprod Genet.* févr 2014;31(2):241-7.
8. Cobo A, de los Santos MJ, Castellò D, Gámiz P, Campos P, Remohí J. Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertil Steril.* nov 2012;98(5):1138-46.e1.
9. Solé M, Santaló J, Boada M, Clua E, Rodríguez I, Martínez F, et al. How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes. *Hum Reprod Oxf Engl.* août 2013;28(8):2087-92.
10. Vanderzwalmen P, Connan D, Grobet L, Wirleitner B, Remy B, Vanderzwalmen S, et al. Lower intracellular concentration of cryoprotectants after vitrification than after slow

- freezing despite exposure to higher concentration of cryoprotectant solutions. *Hum Reprod Oxf Engl.* août 2013;28(8):2101-10.
11. Cobo A, Castellò D, Vallejo B, Albert C, de los Santos JM, Remohí J. Outcome of cryotransfer of embryos developed from vitrified oocytes: double vitrification has no impact on delivery rates. *Fertil Steril.* mai 2013;99(6):1623-30.
 12. Shapiro BS, Daneshmand ST, Restrepo H, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Matched-cohort comparison of single-embryo transfers in fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles. *Fertil Steril.* févr 2013;99(2):389-92.
 13. Nikas G, Develioglou OH, Toner JP, Jones HW. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod Oxf Engl.* mars 1999;14(3):787-92.
 14. Papanikolaou EG, Bourgain C, Kolibianakis E, Tournaye H, Devroey P. Steroid receptor expression in late follicular phase endometrium in GnRH antagonist IVF cycles is already altered, indicating initiation of early luteal phase transformation in the absence of secretory changes. *Hum Reprod Oxf Engl.* juin 2005;20(6):1541-7.
 15. Lee JY, Lee M, Lee SK. Role of endometrial immune cells in implantation. *Clin Exp Reprod Med.* sept 2011;38(3):119-25.
 16. Haouzi D, Assou S, Mahmoud K, Tondeur S, Rème T, Hedon B, et al. Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Hum Reprod Oxf Engl.* juin 2009;24(6):1436-45.
 17. Liu Y, Lee K-F, Ng EHY, Yeung WSB, Ho P-C. Gene expression profiling of human peri-implantation endometria between natural and stimulated cycles. *Fertil Steril.* déc 2008;90(6):2152-64.
 18. Haouzi D, Assou S, Dechanet C, Anahory T, Dechaud H, De Vos J, et al. Controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization alters endometrial receptivity in humans: protocol effects. *Biol Reprod.* avr 2010;82(4):679-86.
 19. Zapantis G, Szmyga MJ, Rybak EA, Meier UT. Premature formation of nucleolar channel systems indicates advanced endometrial maturation following controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod Oxf Engl.* déc 2013;28(12):3292-300.
 20. Ubaldi F, Bourgain C, Tournaye H, Smitz J, Van Steirteghem A, Devroey P. Endometrial evaluation by aspiration biopsy on the day of oocyte retrieval in the embryo transfer cycles in patients with serum progesterone rise during the follicular phase. *Fertil Steril.* mars 1997;67(3):521-6.
 21. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Thomas S. Large blastocyst diameter, early blastulation, and low preovulatory serum progesterone are dominant predictors of clinical pregnancy in fresh autologous cycles. *Fertil Steril.* août 2008;90(2):302-9.

22. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Ross R. Contrasting patterns in in vitro fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony. *Fertil Steril.* janv 2008;89(1):20-6.
23. Melo M a. B, Meseguer M, Garrido N, Bosch E, Pellicer A, Remohí J. The significance of premature luteinization in an oocyte-donation programme. *Hum Reprod Oxf Engl.* juin 2006;21(6):1503-7.
24. Legro RS, Ary BA, Paulson RJ, Stanczyk FZ, Sauer MV. Premature luteinization as detected by elevated serum progesterone is associated with a higher pregnancy rate in donor oocyte in-vitro fertilization. *Hum Reprod Oxf Engl.* sept 1993;8(9):1506-11.
25. Richter KS, Shipley SK, McVeary I, Tucker MJ, Widra EA. Cryopreserved embryo transfers suggest that endometrial receptivity may contribute to reduced success rates of later developing embryos. *Fertil Steril.* oct 2006;86(4):862-6.
26. Doody KJ. Cryopreservation and delayed embryo transfer-assisted reproductive technology registry and reporting implications. *Fertil Steril.* juill 2014;102(1):27-31.
27. Check JH, Choe JK, Katsoff D, Summers-Chase D, Wilson C. Controlled ovarian hyperstimulation adversely affects implantation following in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet.* sept 1999;16(8):416-20.
28. Venetis CA, Kolibianakis EM, Bosdou JK, Tarlatzis BC. Progesterone elevation and probability of pregnancy after IVF: a systematic review and meta-analysis of over 60 000 cycles. *Hum Reprod Update.* oct 2013;19(5):433-57.
29. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Clinical rationale for cryopreservation of entire embryo cohorts in lieu of fresh transfer. *Fertil Steril.* juill 2014;102(1):3-9.
30. Pelkonen S, Hartikainen A-L, Ritvanen A, Koivunen R, Martikainen H, Gissler M, et al. Major congenital anomalies in children born after frozen embryo transfer: a cohort study 1995-2006. *Hum Reprod Oxf Engl.* 7 mai 2014;
31. Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S, Maheshwari A. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* oct 2012;18(5):485-503.
32. Zhu JL, Basso O, Obel C, Bille C, Olsen J. Infertility, infertility treatment, and congenital malformations: Danish national birth cohort. *BMJ.* 30 sept 2006;333(7570):679.
33. Pinborg A, Wennerholm UB, Romundstad LB, Loft A, Aittomaki K, Söderström-Anttila V, et al. Why do singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* avr 2013;19(2):87-104.
34. Henningsen A-KA, Pinborg A, Lidegaard Ø, Vestergaard C, Forman JL, Andersen AN. Perinatal outcome of singleton siblings born after assisted reproductive technology and

- spontaneous conception: Danish national sibling-cohort study. *Fertil Steril*. 1 mars 2011;95(3):959-63.
35. Shih W, Rushford DD, Bourne H, Garrett C, McBain JC, Healy DL, et al. Factors affecting low birthweight after assisted reproduction technology: difference between transfer of fresh and cryopreserved embryos suggests an adverse effect of oocyte collection. *Hum Reprod Oxf Engl*. juill 2008;23(7):1644-53.
 36. Liu SY, Teng B, Fu J, Li X, Zheng Y, Sun XX. Obstetric and neonatal outcomes after transfer of vitrified early cleavage embryos. *Hum Reprod Oxf Engl*. août 2013;28(8):2093-100.
 37. Imudia AN, Awonuga AO, Kaimal AJ, Wright DL, Styer AK, Toth TL. Elective cryopreservation of all embryos with subsequent cryothaw embryo transfer in patients at risk for ovarian hyperstimulation syndrome reduces the risk of adverse obstetric outcomes: a preliminary study. *Fertil Steril*. janv 2013;99(1):168-73.
 38. Ishihara O, Araki R, Kuwahara A, Itakura A, Saito H, Adamson GD. Impact of frozen-thawed single-blastocyst transfer on maternal and neonatal outcome: an analysis of 277,042 single-embryo transfer cycles from 2008 to 2010 in Japan. *Fertil Steril*. janv 2014;101(1):128-33.
 39. Wennerholm U-B, Henningsen A-KA, Romundstad LB, Bergh C, Pinborg A, Skjaerven R, et al. Perinatal outcomes of children born after frozen-thawed embryo transfer: a Nordic cohort study from the CoNARTaS group. *Hum Reprod Oxf Engl*. sept 2013;28(9):2545-53.
 40. Pinborg A, Henningsen AA, Loft A, Malchau SS, Forman J, Andersen AN. Large baby syndrome in singletons born after frozen embryo transfer (FET): is it due to maternal factors or the cryotechnique? *Hum Reprod Oxf Engl*. mars 2014;29(3):618-27.
 41. Shapiro BS, Daneshmand ST, De Leon L, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Frozen-thawed embryo transfer is associated with a significantly reduced incidence of ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. déc 2012;98(6):1490-4.
 42. Kansal Kalra S, Ratcliffe SJ, Milman L, Gracia CR, Coutifaris C, Barnhart KT. Perinatal morbidity after in vitro fertilization is lower with frozen embryo transfer. *Fertil Steril*. févr 2011;95(2):548-53.
 43. Aflatoonian A, Mansoori Moghaddam F, Mashayekhy M, Mohamadian F. Comparison of early pregnancy and neonatal outcomes after frozen and fresh embryo transfer in ART cycles. *J Assist Reprod Genet*. déc 2010;27(12):695-700.
 44. Wong KM, Mastenbroek S, Repping S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertil Steril*. juill 2014;102(1):19-26.
 45. Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. janv 2013;99(1):156-62.

46. Aflatoonian A, Oskouian H, Ahmadi S, Oskouian L. Can fresh embryo transfers be replaced by cryopreserved-thawed embryo transfers in assisted reproductive cycles? A randomized controlled trial. *J Assist Reprod Genet.* juill 2010;27(7):357-63.
47. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril.* août 2011;96(2):344-8.
48. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Freeze-all can be a superior therapy to another fresh cycle in patients with prior fresh blastocyst implantation failure. *Reprod Biomed Online.* 14 mai 2014;
49. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* juin 2000;73(6):1155-8.
50. Levi Setti PE, Albani E, Morengi E, Morreale G, Delle Piane L, Scaravelli G, et al. Comparative analysis of fetal and neonatal outcomes of pregnancies from fresh and cryopreserved/thawed oocytes in the same group of patients. *Fertil Steril.* août 2013;100(2):396-401.
51. Wang Z, Xu L, He F. Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2. *Fertil Steril.* 15 mai 2010;93(8):2729-33.
52. Zhao X-M, Du W-H, Hao H-S, Wang D, Qin T, Liu Y, et al. Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts. *Mol Reprod Dev.* juill 2012;79(7):445-50.
53. Oron G, Son W-Y, Buckett W, Tulandi T, Holzer H. The association between embryo quality and perinatal outcome of singletons born after single embryo transfers: a pilot study. *Hum Reprod Oxf Engl.* juill 2014;29(7):1444-51.
54. Groenewoud ER, Cantineau AEP, Kollen BJ, Macklon NS, Cohlen BJ. What is the optimal means of preparing the endometrium in frozen-thawed embryo transfer cycles? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* oct 2013;19(5):458-70.
55. Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F, et al. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril.* sept 2013;100(3):818-24.
56. Haouzi D, Dechaud H, Assou S, De Vos J, Hamamah S. Insights into human endometrial receptivity from transcriptomic and proteomic data. *Reprod Biomed Online.* janv 2012;24(1):23-34.

Académie d'Orléans – Tours

Université François-Rabelais

Faculté de Médecine de TOURS

CELTON Noémie

Thèse n°

42 pages – 5 tableaux – 7 figures

Résumé :

INTRODUCTION : Une tentative de fécondation *in vitro* se déroule en 3 grandes étapes qui classiquement s'enchainent : recueil des ovocytes et des spermatozoïdes, mise en fécondation de ces gamètes puis transfert d'un des embryons obtenus quelques jours plus tard dans l'utérus. Malgré tous les efforts pour sélectionner un embryon paraissant évolutif lors du transfert, l'implantation dans l'utérus échoue dans plus de la moitié des cas. Dans le but d'améliorer ces résultats, une nouvelle stratégie émerge actuellement : Le transfert embryonnaire différé (« freeze all »). Dans cette prise en charge, le transfert embryonnaire est désynchronisé du reste de la tentative en congelant tous les embryons pour réaliser le transfert à distance de la stimulation ovarienne sur un endomètre plus naturel. En effet dans la littérature, nombre d'articles font part des effets potentiellement délétères des concentrations hormonales supra physiologiques sur l'endomètre secondaire à la stimulation ovarienne pluri folliculaires. Cependant, il existe très peu d'études solides évaluant le bénéfice réel de cette stratégie de prise en charge et l'intérêt du transfert embryonnaire différé reste encore à prouver.

MATÉRIEL ET MÉTHODE : Une étude rétrospective de type cas / témoin a été réalisée sur 18 mois à l'hôpital Cochin : 231 tentatives ayant bénéficié d'un transfert différé pour différentes indications (échecs d'implantation répétés, risque d'hyperstimulation ovarienne, évènements intercurrents en cours de stimulation) ont été appariées à 231 tentatives ayant bénéficié d'un transfert d'embryons frais. Le critère de jugement principal était le taux de grossesse clinique (GC) par tentative. Les critères de jugement secondaires étaient : le taux d'implantation, le taux de grossesse clinique par transfert, le taux de fausse couche spontanée (FCS) et le taux cumulé de grossesse clinique par tentative. Une régression logistique a été réalisée pour prendre en compte les facteurs confondants.

RÉSULTATS : En analyse univariée, il n'a pas été observé de différence significative entre les groupes frais et différé en termes de taux de GC par tentative (respectivement 36% vs 31%, $p=0.21$), taux d'implantation (21% vs 17% ; $p=0.34$), taux de GC par transfert (39% vs 35%, $p=0.38$), et taux cumulé de GC par tentative (41% vs 40%, $p=1$). Le taux de FCS était par contre lui significativement plus élevé dans le groupe avec transfert embryonnaire différé (10% vs 30%, $p=0.003$). En analyse multivariée, le transfert embryonnaire apparaît comme défavorable pour la survenue d'une grossesse avec un odd ratio à 0,6 (IC95% 0,5-0,7, $p=0,02$).

CONCLUSION : Pour les tentatives où le transfert différé est nécessaire pour raisons médicales notamment lors d'un risque d'hyperstimulation, cette stratégie permet de sécuriser la prise en charge des patientes en FIV tout en conservant des chances de grossesse très satisfaisantes. Par contre, contrairement aux données de la littérature, notre analyse met en évidence une diminution des chances de grossesse avec cette stratégie. De plus, la crainte d'un effet cytotoxique de la congélation apparaît devant l'augmentation du nombre de FCS dans le groupe transfert différé. Cette étude devra être poursuivie pour conclure définitivement sur les taux de naissance vivante par tentative.

Mots clés : transfert embryonnaire différé, réceptivité endométriale, congélation embryonnaire

Jury :

Président : Monsieur le Professeur Dominique Royère, CHRU de Tours
Membres : Madame le Docteur Virginie Barraud-Lange, Hôpital Cochin, Paris
Monsieur le Professeur Fabrice Guérif, CHRU de Tours
Madame le Professeur Catherine Patrat, Hôpital Bichat, Paris
Madame le Docteur Marie-Laure Couet, CHRU de Tours

Date de la soutenance : le 31 octobre 2014