



Année 2017

N°

## Thèse

Pour le

### DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

**Charlotte MAUROY**

Née le 8 août 1986 à Coutances (50)

---

### Culture embryonnaire prolongée : 2006-2016

Facteurs pronostiques établis à partir de 26850 embryons : Application à la stratégie de transfert.

---

Présentée et soutenue publiquement le 13 juin 2017 devant un jury composé de :

**Président du Jury** : Professeur Dominique ROYERE, Biologie et médecine du développement et de la reproduction, Faculté de Médecine – Tours

**Membres du Jury** :

Professeur Henry MARRET, Gynécologie Obstétrique, Faculté de Médecine – Tours

Professeur Karine MAHEO, PU, UMR INSERM 1069 Nutrition, Croissance et Cancer, UFR Pharmacie - Tours

Docteur Marion CORNUAU, Biologie et médecine du développement et de la reproduction, PH, CHU - Tours

**Directeur de thèse : Professeur Fabrice GUERIF, Biologie et médecine du développement et de la reproduction, Faculté de Médecine – Tours**



## RESUME

**Introduction :** La culture embryonnaire prolongée jusqu'au stade blastocyste est une aide pour la sélection des embryons les plus viables. Elle est devenue une technique de routine dans notre laboratoire. Son optimisation permettrait d'étendre cette pratique à tous les couples pris en charge en AMP tout en adaptant la stratégie de transfert de blastocystes.

**Matériel et Méthode :** Notre travail a consisté à faire l'état des lieux de la culture embryonnaire prolongée au sein du centre d'AMP du CHRU de Tours entre janvier 2006 et décembre 2016. Cette étude a été réalisée sur des cohortes embryonnaires totales incluant 26850 embryons mis en culture prolongée et a permis d'évaluer différents facteurs pouvant influencer leur développement et leur devenir clinique.

**Résultats :** L'amélioration des conditions de culture a permis une augmentation du taux de blastocystes depuis la mise en place de la culture embryonnaire prolongée sur cohorte totale. Le taux de blastocystes est influencé par la cinétique de développement et l'aspect morphologique à J2, l'âge des femmes, les conditions et les milieux de culture.

La stratégie de transfert doit prendre en compte le jour et le stade d'expansion du blastocyste, l'aspect morphologique de la cohorte de blastocystes obtenue, l'âge de la femme et le rang de la ponction. L'organisation cellulaire des blastocystes à J5/J6 peut être une aide à la décision de transfert mais ses limites doivent être prises en considération.

La décision de mise en culture prolongée de la cohorte embryonnaire peut être influencée par le nombre d'embryons 411 disponibles à J2. En effet, si au moins un embryon 411 est obtenu à J2, le taux de grossesse clinique par ponction lors du transfert d'un blastocyste unique est optimum avec un taux de transfert avoisinant les 95%. Si aucun embryon 411 n'est obtenu à J2, le taux de transfert au stade blastocyste est inférieur à 80%. Cependant, le transfert d'un blastocyste unique améliore le taux de grossesse clinique par ponction versus le transfert d'un embryon unique (34% vs 25%, respectivement). Il est similaire au taux de grossesse clinique par ponction lors du transfert de deux embryons mais il permet une diminution du risque de grossesses multiples.

**Conclusion :** La culture prolongée est un outil permettant de réduire le nombre d'embryons transférés. La proposer à tous les couples expose cependant à un risque d'augmentation d'absence de transfert. Ce risque peut être diminué si les conditions de culture sont optimales. L'impact du taux de grossesse par ponction reste à évaluer pour envisager de proposer cette stratégie à tous les couples pris en charge en AMP.

**Mots clés :** Blastocyste, Culture prolongée, Taux de transfert, Taux d'implantation, Taux de grossesse clinique, Taux de blastocyste.

# **ABSTRACT**

**Extended culture: 2006-2016**

**Prognostic factors established from 26850 embryos:**

**Application to the transfer strategy**

**Introduction:** The extended culture is a help for the selection of the most viable embryos. It became a routine technique of our laboratory. Its optimization would allow to expand this practice on all the couples taken care in AMP while adapting the blastocysts transfer strategy.

**Material and Method:** Our work consisted in making the current situation of the extended culture within the center of AMP of the CHRU of Tours between January, 2006 and December, 2016. This study was realized on embryonic total groups including 26850 embryos put in extended culture and allowed to estimate various factors which can influence their development and their clinical future.

**Results:** The improvement in the culture conditions allowed an increase of the blastocysts rate since the implementation of the extended culture on total group. The blastocysts rate is influenced by the development's kinetics and the morphological aspect at J2, the women age, the cultural conditions and the cultural medium. The transfer strategy must take into account the day and the expansion level of the blastocysts, the morphological aspect of the blastocysts, the woman age and the range of oocyte pick up. The cellular organization of blastocysts at J5 / J6 can be a decision-making support for transfer but its limits have to be considered. The decision of putting the embryonic group in extended culture can be influenced by the number of embryos 411 available at J2. Indeed, if at least an embryo 411 is obtained at J2, the rate of clinical pregnancy during the transfer of a unique blastocyste is optimal with a transfer rate close to 95 %. If no embryo 411 is obtained at J2, the transfer rate at the blastocyste level is lower than 80 %. However, the transfer of a unique blastocyste improves the rate of clinical pregnancy versus the transfer of a unique embryo (34 % vs 25 %, respectively). It is similar to the rate of clinical pregnancy during the transfer of two embryos but allows a decrease the risk of multiple pregnancy.

**Conclusion:** the extended culture is a tool allowing the decrease of the transferred embryos number. However, suggesting doing it at all the couples exposes to a risk of transfer lack. This risk can be decrease if the culture conditions are optimal. The pregnancy rate impact has to be evaluated to consider proposing this strategy to all couples being taking care by AMP.

**Keywords:** Blastocyste, extended Culture, Rate of transfer, Rate of setting-up, Rate of clinical pregnancy, Rate of blastocyste.

**UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS**  
**FACULTE DE MEDECINE DE TOURS**

**DOYEN**

**Pr. Patrice DIOT**

**VICE-DOYEN**

**Pr. Henri MARRET**

**ASSESEURS**

**Pr. Denis ANGOULVANT, Pédagogie**

**Pr. Mathias BUCHLER, Relations internationales**

**Pr. Hubert LARDY, Moyens – relations avec l'Université**

**Pr. Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, Médecine générale**

**Pr. François MAILLOT, Formation Médicale Continue**

**Pr. Patrick VOURC'H, Recherche**

**SECRETAIRE GENERALE**

**Mme Fanny BOBLETER**

\*\*\*\*\*

**DOYENS HONORAIRES**

**Pr. Emile ARON (†) – 1962-1966**

*Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962*

**Pr. Georges DESBUQUOIS (†)- 1966-1972**

**Pr. André GOUAZÉ - 1972-1994**

**Pr. Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004**

**Pr. Dominique PERROTIN – 2004-2014**

**PROFESSEURS EMERITES**

**Pr. Catherine BARTHELEMY**

**Pr. Philippe BOUGNOUX**

**Pr. Etienne DANQUECHIN-DORVAL**

**Pr. Loïc DE LA LANDE DE CALAN**

**Pr. Noël HUTEN**

**Pr. Olivier LE FLOCH**

**Pr. Yvon LEBRANCHU**

**Pr. Elisabeth LECA**

**Pr. Gérard LORETTE**

**Pr. Roland QUENTIN**

**Pr. Alain ROBIER**

**PROFESSEURS HONORAIRES**

**P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – G. BALLON – P. BARDOS – J.L. BAULIEU – C. BERGER – JC. BESNARD – P. BEUTTER – P. BONNET – M. BROCHIER – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – A. GOUAZE – J.L. GUILMOT – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – J. LANSAC – Y. LANSON – J. LAUGIER – P. LECOMTE – G. LELORD – E. LEMARIE – G. LEROY – Y. LHUINTE – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINÉ – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – M. ROBERT – J.C. ROLLAND – A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – B. TOUMIEUX – J. WEILL**

ALISON Daniel .....	Radiologie et imagerie médicale
ANDRES Christian .....	Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis .....	Cardiologie
ANGOULVANT Théodora .....	Pharmacologie clinique
ARBEILLE Philippe .....	Biophysique et médecine nucléaire
AUPART Michel .....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique .....	Cardiologie
BALLON Nicolas .....	Psychiatrie ; addictologie
BARILLOT Isabelle .....	Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe .....	Immunologie
BERNARD Louis .....	Maladies infectieuses et maladies tropicales
BODY Gilles .....	Gynécologie et obstétrique
BONNARD Christian .....	Chirurgie infantile
BONNET-BRILHAULT Frédérique .....	Physiologie
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, mycologie
CHANTEPIE Alain .....	Pédiatrie
COLOMBAT Philippe .....	Hématologie, transfusion
CONSTANS Thierry .....	Médecine interne, gériatrie
CORCIA Philippe .....	Neurologie
COSNAY Pierre .....	Cardiologie
COTTIER Jean-Philippe .....	Radiologie et imagerie médicale
COUET Charles .....	Nutrition
DE TOFFOL Bertrand .....	Neurologie
DEQUIN Pierre-François .....	Thérapeutique
DESTRIEUX Christophe .....	Anatomie
DIOT Patrice .....	Pneumologie
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague .....	Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri .....	Endocrinologie, diabétologie, et nutrition
DUMONT Pascal .....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
EL HAGE Wissam .....	Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan .....	Réanimation
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
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
GUYETANT Serge .....	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel .....	Hématologie, transfusion
HAILLOT Olivier .....	Urologie
HALIMI Jean-Michel .....	Thérapeutique
HANKARD Régis .....	Pédiatrie
HERAULT Olivier .....	Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis .....	Radiologie et imagerie médicale
LABARTHE François .....	Pédiatrie
LAFFON Marc .....	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
LARDY Hubert .....	Chirurgie infantile
LARIBI Saïd .....	Médecine d'urgence
LARTIGUE Marie-Frédérique .....	Bactériologie-virologie
LAURE Boris .....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECOMTE Thierry .....	Gastroentérologie, hépatologie
LESCANNE Emmanuel .....	Oto-rhino-laryngologie
LINASSIER Claude .....	Cancérologie, radiothérapie
MACHET Laurent .....	Dermato-vénéréologie
MAILLOT François .....	Médecine interne
MARCHAND-ADAM Sylvain .....	Pneumologie
MARRET Henri .....	Gynécologie-obstétrique

MARUANI Annabel .....	Dermatologie-vénéréologie
MEREGHETTI Laurent .....	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MORINIERE Sylvain .....	Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa .....	Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis .....	Rhumatologie
ODENT Thierry .....	Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi .....	Chirurgie digestive
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-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean .....	Ophthalmologie
QUENTIN Roland .....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
REMERAND Francis .....	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe .....	Biologie cellulaire
ROSSET Philippe .....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
ROYERE Dominique .....	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
RUSCH Emmanuel .....	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline .....	Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem .....	Chirurgie digestive
SALIBA Elie .....	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
SANTIAGO-RIBEIRO Maria .....	Biophysique et médecine nucléaire
SIRINELLI Dominique .....	Radiologie et imagerie médicale
THOMAS-CASTELNAU Pierre .....	Pédiatrie
TOUTAIN Annick .....	Génétique
VAILLANT Loïc .....	Dermato-vénéréologie
VELUT Stéphane .....	Anatomie
VOURC'H Patrick .....	Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé .....	Immunologie

## PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

---

LEBEAU Jean-Pierre  
LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie

## PROFESSEURS ASSOCIES

---

MALLET Donatien..... Soins palliatifs  
POTIER Alain..... Médecine Générale  
ROBERT Jean..... Médecine Générale

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

---

BAKHOS David .....	Physiologie
BARBIER Louise .....	Chirurgie digestive
BERNARD-BRUNET Anne .....	Cardiologie
BERTRAND Philippe .....	Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication
BLANCHARD Emmanuelle .....	Biologie cellulaire
BLASCO Hélène .....	Biochimie et biologie moléculaire
CAILLE Agnès .....	Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication
DESOUBEUX Guillaume .....	Parasitologie et mycologie
DOMELIER Anne-Sophie .....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane .....	Biophysique et médecine nucléaire
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie .....	Anatomie et cytologie pathologiques
GATAULT Philippe .....	Néphrologie
GAUDY-GRAFFIN Catherine .....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUILLEUX Valérie .....	Immunologie
GUILLON Antoine .....	Réanimation
GUILLON-GRAMMATICO Leslie .....	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
HOARAU Cyrille .....	Immunologie
HOURIOUX Christophe .....	Biologie cellulaire
IVANES Fabrice .....	Physiologie
LE GUELLEC Chantal .....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
MACHET Marie-Christine .....	Anatomie et cytologie pathologiques
PIVER Éric .....	Biochimie et biologie moléculaire

ROUMY Jérôme .....	Biophysique et médecine nucléaire
PLANTIER Laurent .....	Physiologie
SAMIMI Mahtab .....	Dermatologie-vénéréologie
TERNANT David .....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
ZEMMOURA Ilyess .....	Neurochirurgie

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

---

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia .....	Neurosciences
DIBAO-DINA Clarisse .....	Médecine Générale
LEMOINE Maël .....	Philosophie
MONJAUZE Cécile .....	Sciences du langage - orthophonie
PATIENT Romuald .....	Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile.....	Médecine Générale

## CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

---

BOUAKAZ Ayache .....	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
CHALON Sylvie.....	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
COURTY Yves .....	Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
DE ROCQUIGNY Hugues.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 966
ESCOFFRE Jean-Michel .....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
GILOT Philippe.....	Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
GOUILLEUX Fabrice.....	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
GOMOT Marie.....	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
HEUZE-VOURCH Nathalie .....	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
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
MAZURIER Frédéric .....	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
MEUNIER Jean-Christophe .....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 966
PAGET Christophe.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
RAOUL William .....	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
SI TAHAR Mustapha.....	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
WARDAK Claire .....	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT

---

### ***Pour l'Ecole d'Orthophonie***

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

### ***Pour l'Ecole d'Orthoptie***

LALA Emmanuelle .....	Praticien Hospitalier
MAJZOUB Samuel.....	Praticien Hospitalier

### ***Pour l'Ethique Médicale***

BIRMELE Béatrice .....	Praticien Hospitalier
------------------------	-----------------------

U.F.R. des Sciences Pharmaceutiques « Philippe Maupas »  
31, avenue Monge  
37200 TOURS

**ANNEE : 2015 - 2016**

**Doyen : Pr Alain GUEIFFIER**

**Vice - Doyen : Pr Véronique MAUPOIL**

**Assesseurs : Pr Stéphane CHEVALIER, M. Hervé MARCHAIS**

## **ENSEIGNANTS**

### **20 PROFESSEURS**

AGAFONOV	Viatcheslav	CHIMIE PHYSIQUE
ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CRECHE	Joël	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DELONCLE	Roger	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DOMENECH	Jorge	HEMATOLOGIE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
GIRAudeau	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
GUEIFFIER	Alain	CHIMIE THERAPEUTIQUE
GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL	Véronique	PHARMACOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

### **1 PROFESSEUR EMERITE**

RIDEAU	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
--------	------	--

### **38 MAITRES DE CONFERENCES**

ALLARD	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BOUESOCQUE - DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
COURTOIS	Martine	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAYE	Pierre-Oliver	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE

**U.F.R. des Sciences Pharmaceutiques « Philippe Maupas »**

**31, avenue Monge**

**37200 TOURS**

**DOUZIECH-EYROLLES  
DUMAS  
GERMON  
GLEVAREC  
HERVE-AUBERT  
JUSTE  
LANOTTE  
LANOUE  
LESAGE  
MARCHAIS  
MAVEL  
MUNNIER  
OMBETTA-GOKA  
OUDIN  
PRIE  
SOUCE  
TAUBER  
VELGE-ROUSSEL  
VERCOILLIE  
VERGOTE  
VIERRON  
ZHANG**

**Laurence  
Jean-François  
Stéphanie  
Gaëlle  
Katel  
Matthieu  
Philippe  
Arnaud  
Gérard  
Hervé  
Sylvie  
Emilie  
Jean-Edouard  
Audrey  
Gildas  
Martin  
Clovis  
Florence  
Johnny  
Jackie  
Emilie  
Bei-Li**

**CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE  
BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE  
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE  
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE  
CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE  
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE  
MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE  
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE  
MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE  
PHARMACIE GALENIQUE  
CHIMIE THERAPEUTIQUE  
PHARMACIE GALENIQUE  
CHIMIE ORGANIQUE  
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE  
CHIMIE ORGANIQUE  
CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE  
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES  
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE  
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES  
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES  
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES  
PHARMACOLOGIE**

***1 DIRECTEUR DE RECHERCHE***

**CHALON**

**Sylvie**

**INSERM**

***2 CHARGES DE RECHERCHE***

**MEVELEC  
MOIRE**

**Marie-Noëlle  
Nathalie**

**INRA  
INRA**

***1 PRAG***

**WALTERS-GALOPIN**

**Susan**

**ANGLAIS**

***1 AHU***

**RESPAUD**

**Renaud**

**CHIMIE ANALYTIQUE**

***2 ATER***

**BOUVIN-PLEY  
CORBIN**

**Mélanie  
Cyrielle**

**MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE  
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE**

# 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 dans 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

**Monsieur le Professeur Dominique ROYERE**, vous me faites l'honneur de présider ma thèse et de juger mon travail. J'ai eu la chance d'assister à vos enseignements au cours de mes études de médecine et de découvrir avec passion la Biologie de la Reproduction. Je vous transmets mon respect et ma reconnaissance.

**Monsieur le Professeur Henry MARRET**, je suis honorée de votre présence au sein de mon jury de thèse. Votre point de vue en tant que Gynécologue-Obstétricien sera d'un grand intérêt pour moi.

**Madame le Professeur Karine MAHEO**, je vous remercie de l'intérêt que vous portez à mon travail de thèse en acceptant de faire parti de mon jury. Je prendrai avec grande considération tous les conseils que vous pourrez m'apporter.

**Madame le Docteur Marion CORNUAU**, je te remercie de me faire l'honneur d'assister à ma thèse en tant que jury. Ton professionnalisme et ton amitié a été d'une grande importance au cours de ces deux années. Merci de m'avoir transmis toutes tes connaissances cliniques essentielles à ma pratique future mais également de m'avoir soutenue dans toutes les circonstances, qu'elles soient professionnelles et personnelles.

**Monsieur le Professeur Fabrice GUERIF**, je vous remercie d'avoir dirigé mon travail de thèse que je vais présenter avec fierté. Ce fut un honneur et une grande chance pour moi d'avoir été formée à vos côtés. Vous m'avez apporté, avec une disponibilité et une confiance rares, toutes les connaissances nécessaires pour que je termine sereine mon internat. Je n'oublierai pas que grâce à vous et à votre soutien, j'ai pu accéder à une formation de grande qualité en Médecine et Biologie de la Reproduction. Je vous transmets ma plus grande reconnaissance.

**Madame le Docteur Cynthia FRAPSAUCE**, j'ai tellement de remerciement à te faire que je ne sais pas par où commencer. Tu m'as apporté toutes les connaissances pratiques et théoriques qui me permettront d'exercer cette profession avec qualité. Tu as été un modèle de professionnalisme, de gentillesse, de bonté et de patience durant ces deux années. Je ne peux pas oublier ton soutien, ta compréhension et ton écoute. Tu m'as aidé à prendre des décisions personnelles essentielles. Au-delà de notre relation de travail, tu es devenu une véritable amie. Je repars le cœur léger car je sais que notre amitié sera pérenne.

**Les cliniciens**, le Docteur Marie Laure COUET, le Docteur Véronique RACT, le Docteur Olivia GERVEREAU, le Docteur Michel LANOUE, le Docteur Jennifer CARRIERE, je vous remercie pour votre disponibilité, votre confiance et votre bonne humeur. Merci d'avoir eu la patience de répondre à toutes mes questions. Vos expériences et vos connaissances professionnelles seront essentielles pour moi.

**Les techniciens**, Armonie, Chantal, Charline, Danielle, Olivier, Rachel et notre secrétaire biologique Maryline, je vous remercie de m'avoir transmis avec patience toutes vos connaissances pratiques et théoriques. Vous m'avez appris toutes les techniques d'aide médicale à la procréation mais vous m'avez également transmis votre organisation et votre rigueur qui est essentiel pour un travail de qualité au sein d'un laboratoire. Merci également pour votre soutien, pour votre gentillesse, pour tous ces moments de rire et de bonheur que j'ai passé avec vous. Merci d'avoir été à mon écoute quand j'en avais besoin. Vous allez me manquer mais avec grand bonheur, je repars avec des amis.

**Les sages-femmes et notre infirmière**, je vous remercie pour votre professionnalisme, votre gentillesse et votre écoute.

**Les secrétaires cliniques**, vous m'avez toujours aidé avec beaucoup de volonté et de patience lorsque j'en avais besoin.

**Mes co-internes cliniques**, mes petites louloutes, Camille et Camille, Floriane et Judith, de si belles rencontres. Je me souviendrai de nos moments de fous rires et il y en a eu beaucoup, de notre entraide si chère, de nos moments de partage.

**Ma petite Sandra**, merci pour ton écoute, ta gentillesse et ces moments de complicité. Je n'oublierai pas ces débuts d'après midi si spéciaux. Tu as su me faire rire quand j'en avais besoin. Ton amitié m'est très chère.

**Mes parents**, votre éducation, votre amour m'ont permis d'être ce que je suis maintenant. Tout au long de ces longues études, vous avez été présents à tout moment, vous avez été mon pilier, ma force pour réussir. Vous avez été mes confidents, mon soutien, mon mental, mon équilibre. Je vous dois tout ce que je suis et ce que j'ai réussi.

**Mon frère et ma sœur**, vous m'avez montré le chemin de la réussite pour laquelle la règle du « jamais deux sans trois » se confirme à nouveau. Malgré la distance qui nous sépare, vous avez su être là aux moments opportuns. C'est une chance de se savoir guider par votre aura.

**Nicolas**, mon amour, tu as su t'adapter à ma vie professionnelle avec une aisance incroyable en m'aidant à chaque instant jusqu'à la mise en forme de ma thèse (Merci d'ailleurs d'avoir passé une matinée à mettre en page ma table des matières). Tu as été mon soutien de tous les jours et c'est avec toi que je veux commencer ma nouvelle vie à la montagne. Tu as changé mon quotidien. Ensemble tout est possible : « Les cimes me guident, Saint Bernard veille ».

*« Gli angeli vengono se tu li preghi,*

*e quando arrivano, ti guardano,*

*ti sorridono e se ne vanno per lasciarti*

*il ricordo di un sogno*

*lungo una notte, che vale una vita »*

*Tiziano Ferro*

A Lui

# Table des matières

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>2</b>
<b>2. PRESENTATION DU SUJET .....</b>	<b>4</b>
2.1- Développement embryonnaire <i>in vivo</i> .....	5
2.1.1- La fécondation .....	5
2.1.2- stade embryonnaire .....	6
2.1.3- Stade blastocyste .....	7
2.1.4- Le métabolisme de l'embryon .....	9
2.2- Développement embryonnaire <i>in vitro</i> .....	11
2.2.1- Pourquoi favoriser le transfert d'embryons au stade blastocyste ? .....	11
2.2.2- Facteurs influençant le développement de l'embryon jusqu'au stade blastocyste .....	13
<b>3. MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>18</b>
3.1- Conditions de l'étude .....	19
3.2- Conditions au laboratoire.....	20
3.2.1- La mise en fécondation .....	20
3.2.2- Les milieux de culture prolongée .....	23
3.2.3- La mise en culture prolongée .....	23
3.2.4- Les incubateurs .....	23
3.2.5- L'observation morphologique précoce.....	25
3.2.6- L'observation morphologique tardive .....	28
3.2.7- Le transfert .....	29
3.2.8- Le suivi .....	30
3.3- Analyses statistiques.....	31
<b>4. RESULTATS .....</b>	<b>32</b>
4.1- Evolution des pratiques.....	33
4.1.1- Evolution globale de la mise en culture prolongée des cohortes totales embryonnaires .....	33
4.1.2- Evolution du taux de blastocystes.....	34
4.2- Facteurs influençant le développement au stade blastocyste .....	35
4.2.1- Influence de la morphologie embryonnaire à J2 .....	35
4.2.2- Influence de l'âge de la femme .....	42
4.2.3- Influence de la technique de fécondation et de l'origine du sperme .....	44
4.2.4- Influence des milieux de culture prolongée .....	46
4.2.5- Influence du renouvellement de milieu à J4.....	48
4.2.6- Influence des conditions physiques de culture.....	49
4.3- Stratégie de transfert au stade blastocyste.....	51
4.3.1- Aspect morphologique du blastocyste et implantation.....	51
4.3.2- Application clinique .....	54
<b>5. DISCUSSION .....</b>	<b>62</b>
5.1- Quels sont les paramètres influençant le développement au stade blastocystes ? .....	64
5.1.1- Les caractéristiques morphologiques des embryons .....	64
5.1.2- L'âge de la femme.....	67
5.1.3- La technique de fécondation.....	67
5.1.4- L'origine du sperme .....	68
5.1.5- Les milieux de culture .....	68
5.1.6- Les conditions physiques de culture.....	69
5.2- Quelle stratégie de transfert ? .....	71
5.2.1- Jour et stade d'expansion .....	71
5.2.2- Trophodermes et masse cellulaire interne.....	72
5.2.3- Rang de la ponction et âge de la patiente .....	73
5.2.4- Congélation de blastocyste au cours du cycle de la ponction .....	75
5.3- La culture prolongée en systématique ? .....	76
5.3.1- En fonction de la qualité des embryons à J2 .....	77
<b>6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>78</b>
<b>7. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>81</b>



# 1- INTRODUCTION

Le succès de la Fécondation *In Vitro* (FIV) repose sur le transfert d'embryons présentant un potentiel d'implantation élevé. Afin d'optimiser au maximum les résultats de la FIV, le biologiste doit être capable de sélectionner, parmi une cohorte, le meilleur embryon à transférer.

L'approche la plus commune pour évaluer la qualité des embryons est la description morphologique des embryons à J2/J3. Cette dernière est une aide pour décider du devenir biologique de l'embryon (transfert, culture prolongée, congélation, élimination). Cependant, elle reste une méthode subjective dont la corrélation entre paramètres morphologiques et taux d'implantation reste insuffisante. De plus, cette observation intervient précocement au cours du développement embryonnaire préimplantatoire, avant que l'activation génomique ne soit effectuée et certains embryons arrêtent leur développement par la suite. C'est pourquoi, certaines équipes ont développé la culture prolongée *in vitro* de l'embryon au sein de leur laboratoire, dans un premier temps seulement pour les embryons surnuméraires puis, dans un second temps, pour des cohortes embryonnaires totales en vue du transfert embryonnaire au stade blastocyste. Des études ont démontré que le transfert d'embryons frais au stade blastocyste augmenterait les taux d'implantation. En effet, la culture prolongée aiderait à identifier les embryons pour lesquels l'activation génomique a été effectuée, permettant une sélection embryonnaire plus précise afin de transférer le blastocyste dont la qualité est la plus optimale.

Cette sélection a permis de limiter considérablement le nombre d'embryons transférés par tentatives ce qui a significativement réduit les taux de grossesse multiple et donc les risques de morbi-mortalité foeto-maternels associés.

Actuellement, devant l'efficacité de cette technique comme outil de sélection embryonnaire, elle est devenue une technique de routine, utilisée dans de nombreux laboratoires d'Aide Médicale à la Procréation (AMP).

Le centre d'Aide Médical à la Procréation du CHRU de Tours a pris le parti de développer la culture prolongée depuis la fin des années 90 pour améliorer les chances des couples à débiter une grossesse en réduisant les risques de grossesse multiple par la stratégie du transfert unique.

Mon travail a consisté en un état des lieux de la culture prolongée dans le centre de Tours entre janvier 2006 et décembre 2016. Un suivi individuel des embryons de J2 à J5/J6 a été réalisé au cours de cette période sur des cohortes embryonnaires totales afin de permettre une optimisation de cette technique et d'appréhender au mieux l'évolution de la culture embryonnaire jusqu'au stade blastocyste dans notre centre.

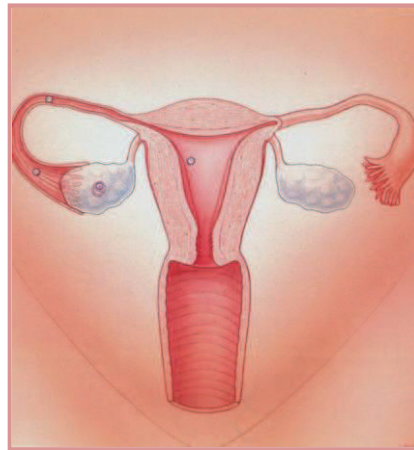
## 2- PRESENTATION DU SUJET

## 2.1- Développement embryonnaire *in vivo*

### 2.1.1- La fécondation

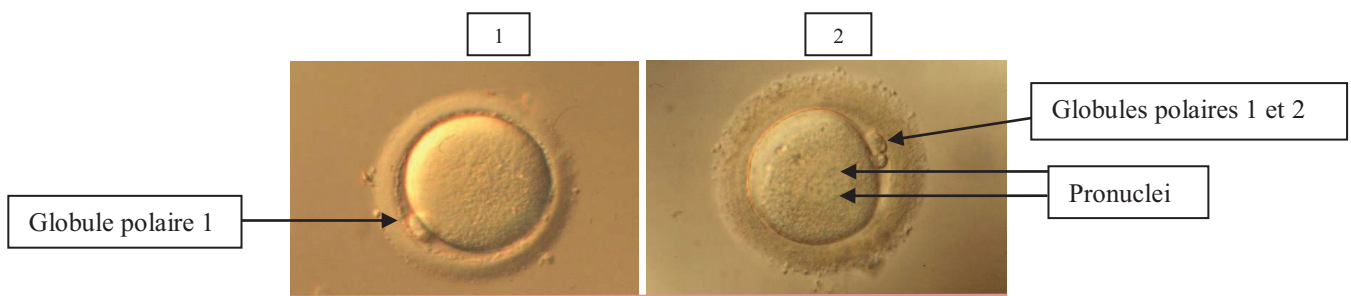
La fécondation a lieu dans l'ampoule isthmo-tubaire de la trompe, après l'ovulation (cf **figure 1**).

Afin de rejoindre le site de fécondation et être apte à l'interaction avec l'ovocyte, les spermatozoïdes vont subir diverses transformations lors de leur transit dans les voies génitales féminines telles que la capacitation, afin d'acquérir un mouvement de type hyperactif leur permettant de rejoindre le lieu de rencontre des gamètes, et la réaction acrosomique favorisant la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte.



**Figure 1 :** Site de fécondation et étapes de migration de l'embryon.

Une fois fécondé, l'ovocyte va subir une phase d'activation reposant sur des oscillations calciques et aboutissant à l'expulsion du second globule polaire et des granules corticaux essentiels pour le blocage de la polyspermie. La décondensation du noyau spermatique permettra par la suite d'aboutir à la formation d'un zygote diploïde apte à se diviser (cf **figure 2**).



**Figure 2 :** Ovocyte mature (1) et zygote (2).

### 2.1.2- Stade embryonnaire

La segmentation débute entre 26 et 28 heures après la fécondation. L'œuf atteint un stade à 4 cellules environ 48 heures après la fécondation puis 8 cellules à 72 heures.

Lors des premières phases de divisions mitotiques, les ARNm et les protéines nécessaires aux mitoses proviennent essentiellement des réserves accumulées par l'ovocyte au cours de la folliculogénèse. C'est aux environs du troisième jour (stade 4-8 cellules) que l'activation génomique va s'effectuer, étape cruciale pour permettre à l'embryon humain de poursuivre son développement (Braude et al. 1988). Deux types d'informations génétiques vont alors coexister et permettre à l'embryon d'évoluer : le génome maternel, transcrit au cours de l'ovogénèse et le génome embryonnaire. Ces deux génomes sont étroitement liés. En effet, Hamatani a décrit que certaines protéines maternelles étaient capables de modifier la structure chromatinienne du génome embryonnaire et de participer ainsi à son activation transcriptionnelle (Hamatani et al. 2006).

Entre le stade 8-16 cellules, l'augmentation des contacts intercellulaires va entraîner une compaction des cellules embryonnaires. Des jonctions cellulaires vont apparaître à type de jonctions serrées permettant la mise en place d'une polarisation cellulaire, des jonctions adhérentes et des GAP jonctions assurant la communication inter cellulaire.

A l'issue de cette compaction, les cellules externes isolent les cellules internes du milieu extra-embryonnaire. La différenciation cellulaire permettant l'individualisation du trophoctoderme et de la masse cellulaire interne est initiée.

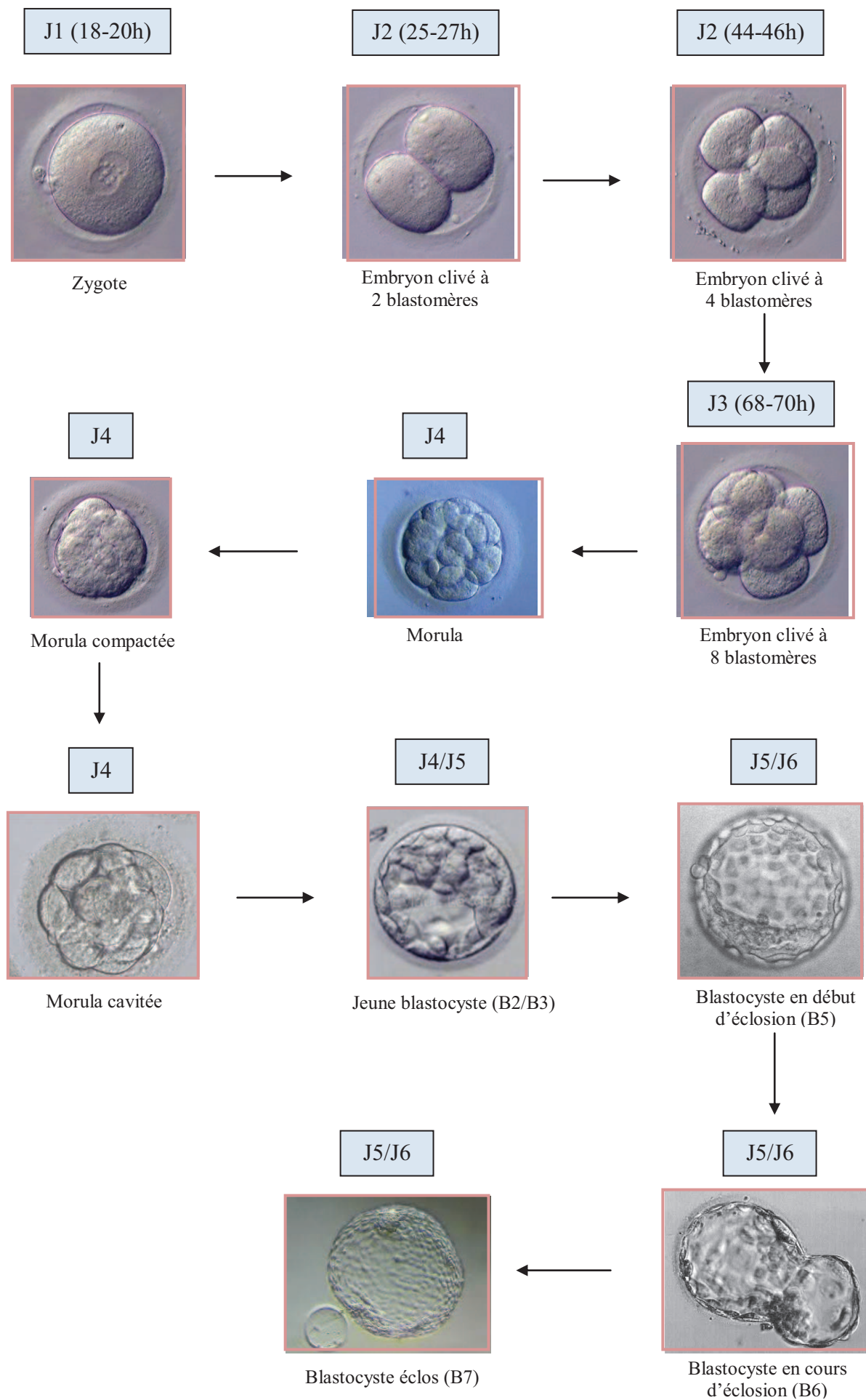
### 2.1.3- Stade blastocyste

Les pompes Na/K ATPase au niveau des cellules de la morula compactée associées aux aquaporines vont permettre une entrée d'eau à l'intérieur de la morula, formant des espaces intercellulaires qui fusionnent progressivement afin de constituer une cavité unique appelée blastocèle (cf **figure 3**). Les blastomères centraux constituent alors le bouton embryonnaire ou masse cellulaire interne (MCI). Ces dernières vont s'orienter à un pôle du blastocyste. Elles seront à l'origine de l'embryon proprement dit. Les blastomères périphériques vont constituer le trophoctoderme. Elles vont s'aplatir et former la paroi régulière du blastocyste. Elles seront à l'origine des annexes extra-embryonnaires telles que le placenta.

A ce stade, les blastomères deviennent pluripotentes avec une expression préférentielle du génome d'origine maternelle dans les blastomères centraux et une expression du génome d'origine paternelle dans les blastomères d'origine périphériques.

Le blastocyste va alors subir une phase d'expansion avec le développement du blastocèle provoqué par l'entrée d'eau et un amincissement de sa zone pellucide qui se rompra, entraînant l'éclosion du blastocyste. Cette étape est indispensable à l'interaction du blastocyste avec la muqueuse endométriale, mettant en jeu les cellules du trophoctoderme.

L'implantation ou nidation s'effectue aux alentours du 6<sup>ème</sup>/7<sup>ème</sup> jour après la fécondation.



**Figure 3 :** Phases de développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste.

## 2.1.4- Le métabolisme de l'embryon

### a) La régulation du pH

Le pH nécessaire à la survie de l'embryon est de 7,4. Aux stades embryonnaires précoces, il est capable de résister à un stress alcalin grâce à son échangeur  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  (Baltz et al. 1990). C'est au stade blastocyste qu'il va acquérir un échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  lui permettant de résister à un stress acide, rencontré notamment au niveau de l'utérus (Dale et al. 1998).

### b) Les carbohydrates

Entre les stades 1 et 8 cellules, l'énergie produite par l'embryon provient principalement de l'oxydation des acides carboxyliques pyruvate et lactate.

Le pyruvate permettra d'assurer les premiers clivages et le développement jusqu'au stade morula (Brown et al. 1991)

C'est à partir du stade morula que l'embryon utilisera le glucose comme principale source d'énergie par l'intermédiaire de la glycolyse. En cas d'absence de glucose dans les milieux de culture, il y aura un blocage au stade morula. En effet, une exposition transitoire au glucose lève ce blocage au stade morula si celle-ci survient avant la compaction. Elle permet d'induire l'expression du gène GLUT 3, transporteur essentiel à l'entrée du glucose dans les cellules du trophoctoderme (Pantaleon et al. 2007).

### c) Les acides aminés

In vivo, les acides aminés sont essentiels pour le développement embryonnaire. Parmi leurs différents rôles, la méthylation de l'ADN et la synthèse protéique en sont les principaux. L'apport des acides aminés est assuré par les fluides tubaires et utérins, par l'intermédiaire de différents mécanismes de transports actifs mais aussi par synthèse endogène ainsi que par le catabolisme de peptides et de protéines.

David Gardner et Mickael Lane ont mis en évidence que l'utilisation des acides aminés au cours du développement embryonnaire évolue (Lane et Gardner, 1994). Du stade zygote au stade 8 cellules, l'utilisation d'acides aminés non essentiels sera privilégiée. Par la suite, les acides aminés essentiels seront également nécessaires pour le bon développement embryonnaire.

L'addition d'acides aminés libres dans les milieux de culture *in vitro* est un prérequis nécessaire à un développement embryonnaire harmonieux. Cependant, la complication principale de ces acides aminés est la production d'ions ammonium délétères issus du catabolisme protéique.

#### d) Les lipides

L'embryon va assurer ses synthèses membranaires en incorporant directement des acides gras libres, saturés et insaturés (Flynn et Hillman. 1980) dont la majorité sont liés à l'albumine et en réalisant une synthèse de phospholipides à partir de choline exogène et de métabolites dérivés du glucose (Pratt. 1980). Le stock endogène de cholestérol est normalement suffisant pour assurer le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste même si l'embryon à un stade précoce est capable d'en réaliser la synthèse à partir du mévalonate et du lanostérol (Pratt. 1982).

#### e) Les protéines

L'albumine est le principal constituant de l'environnement embryonnaire. Toutefois, certains facteurs de croissance jouent un rôle important pour la croissance et la différenciation au stade morula (Croteau et Ménezo. 1994). En effet, l'insuline stimulerait la prolifération de la masse cellulaire interne (Lighten et al. 1998), l'association EGF/TGF alpha stabiliserait le rapport masse cellulaire interne/trophectoderme et le TGF bêta jouerait un rôle dans la différenciation cellulaire (Paria et al. 1990).

## 2.2- Développement embryonnaire *in vitro*

La difficulté du développement embryonnaire *in vitro* consiste à reproduire à l'identique les conditions retrouvées en situation naturelle afin de permettre d'aboutir à une implantation et, en finalité, à une grossesse.

La culture embryonnaire précoce (J2/J3) était la technique la plus utilisée initialement au sein des centres d'Aide Médicale à la Procréation. Cependant, les taux d'implantation restaient modérés, avoisinant les 20-25% malgré l'évolution des techniques de Fécondation *In Vitro*.

C'est pourquoi se sont développées les techniques de cultures prolongées permettant le développement des embryons jusqu'au stade blastocyste et améliorant les taux d'implantation et de grossesse clinique.

### 2.2.1- Pourquoi favoriser le transfert d'embryons au stade Blastocyste ?

#### a) Synchronisation physiologique endométriale

Au cours d'un cycle naturel, l'implantation s'effectue environ 6-7 jours après la fécondation.

De ce fait, le transfert d'un embryon dans la cavité utérine 5-6 jours après la stimulation augmenterait les chances d'implantation par une meilleure synchronisation entre le stade de l'embryon et l'aspect de l'endomètre (Kolibianakis et al. 2002).

➡ **Le transfert utérin au stade blastocyste est plus physiologique.**

#### b) Réduction des contractions utérines

Il a été démontré qu'une fréquence élevée de contractions utérines au moment du transfert embryonnaire serait associée à une réduction des taux d'implantation et de grossesses cliniques. L'une des hypothèses serait l'expulsion possible de l'embryon au moment du transfert. Ces contractions diminueraient dans les quelques jours suivant l'injection de l'hCG (Fanchin et al. 2001).

➡ **Meilleures conditions de réceptivité utérine.**

### c) Sélection embryonnaire

Le génome embryonnaire s'active vers le stade 8 cellules soit au cours du troisième jour. Il a été rapporté des taux d'implantation plus élevés après transfert d'embryons sans anomalie chromosomique en comparaison avec des transferts d'embryons aneuploïdes (Munné et al. 2003). La culture prolongée jusqu'au cinquième ou sixième jour est un moyen d'identifier les embryons ayant activé leur génome sans préjuger de leur ploïdie (Braude et al. 1988).

➡ **Sélectionner des embryons ayant réalisé avec succès la transition génome maternel-génome embryonnaire.**

### d) Transfert d'un seul blastocyste

La sélection plus précise des embryons au stade blastocyste permet de limiter le nombre d'embryons transférés par tentative limitant les taux de grossesse multiple et donc les risques de morbi-mortalité foeto-maternels associés (Papanikolaou et al. 2006; Zech et al. 2007 ; Guerif et al. 2009a).

➡ **Limiter les grossesses multiples en favorisant le transfert d'un seul blastocyste.**

### e) Taux d'implantation et de naissances

Le transfert de blastocystes à J5/J6 améliore les taux d'implantation de 36% en cas de transfert au stade blastocyste contre 29,4% en cas de transfert au stade embryonnaire (Blake DA et al. 2007) ainsi que le taux de naissance selon la méta-analyse de Papanikolaou EG et al en 2008.

➡ **Améliore les taux d'implantation et de grossesse.**

### f) Diagnostic préimplantatoire

Le screening embryonnaire au stade blastocyste serait plus fiable du fait de la possibilité de prélever un nombre de cellules plus important (trophectoderme) et permettant ainsi une étude plus précise et plus étendue du ou des gènes recherchés dans le cadre d'un diagnostic préimplantatoire (Scott et al. 2013).

➡ **Améliore la fiabilité du diagnostic préimplantatoire.**

## 2.2.2- Facteurs influençant le développement de l'embryon jusqu'au stade blastocyste.

### a) Les conditions de culture

Le principal rôle d'un laboratoire d'Aide Médicale à la Procréation est de maintenir la viabilité des gamètes et des embryons en dehors de la cavité utérine sans nuire à leur développement. Pour cela, il est nécessaire que l'environnement *in vitro* soit favorable afin de maximiser la qualité des embryons et les chances de grossesse (Gardner et al. 2000a 2000b). Une perturbation de cet environnement serait délétère et réduirait la viabilité des embryons (Thompson et al. 1995).

En effet, il a été démontré que la susceptibilité de l'embryon précoce à son environnement est plus importante secondairement à une faible capacité à réguler son pH intracellulaire et les perturbations osmotiques (Steeves and Baltz 2005 ; Rooke et al. 2007). C'est pourquoi, une perturbation de son environnement telle qu'une modification du pH, de la pression osmotique ou de la quantité de CO<sub>2</sub> peut altérer le développement embryonnaire et compromettre la viabilité des embryons.

Le stade le plus sensible aux variations de l'environnement serait le stade du clivage lors de l'activation du génome embryonnaire (Zander et al. 2006). Une modification de l'environnement au moment de l'activation du génome embryonnaire réduirait les chances de développement jusqu'au stade blastocyste (Zander et al. 2006).

Il est donc important de mettre en place au sein d'un laboratoire d'Aide Médicale à la Procréation des contrôles internes afin de vérifier les conditions environnementales dans lesquelles les embryons se développent. Il est nécessaire que ces conditions restent stables pour maximiser les chances de développement des embryons ainsi que d'implantation future.

#### • *Les incubateurs*

Trois critères essentiels peuvent perturber le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste lorsqu'ils ne sont pas contrôlés :

- la température
- le niveau de CO<sub>2</sub>
- le niveau d'O<sub>2</sub>

La stabilité des conditions de culture est un critère important à considérer pour maintenir un taux de blastocystes élevé et stable (Gardner et Lane. 2001). Cependant, l'observation quotidienne des embryons avec sortie répétée des

boîtes hors des incubateurs pourrait conduire à une diminution du taux de blastocystes (Zhang et al. 2009) en affectant la viabilité des embryons et en réduisant le nombre de cellules au stade blastocyste (McKiernan and Bavister 1990 ; Wakayama et al. 2004 ; Jousan and Hansen 2007 ; Sugiyama et al. 2007).

➡ **Disposer d'un nombre suffisant d'étuves afin de diminuer l'ouverture des portes et maintenir constantes les conditions de culture.**

*In vivo*, les embryons humains sont exposés à des concentrations en oxygène ne dépassant pas les 8% (Bayatt-Smith et al. 1991 ; Fisher and Bavister. 1993). A la suite de cette observation, de nombreuses études ont démontré que la culture embryonnaire sous faible concentration en oxygène favorisait le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste (Karja et al. 2004 ; Leonie et al. 2007). En effet, les embryons cultivés sous une atmosphère à 5% d'oxygène ont plus de chance de se développer au stade blastocyste (Dumoulin et al. 1999) et d'aboutir à des blastocystes de meilleure qualité (Kovacic et al. 2008). C'est aux stades tardifs de développement que l'embryon présente une plus grande sensibilité aux fortes concentrations en oxygène avec des anomalies reposant principalement sur l'organisation du bouton embryonnaire (Van Soom et al. 2002 ; Bavister. 2004), sur l'organisation des organites et des membranes (Kwon et al. 1999) ainsi que sur l'expression de certains gènes du fait d'une altération de l'ADN (Iwata et al. 2000 ; Harvey et al. 2004). C'est en comparant les étuves trois gaz (5% en oxygène, 6% en dioxyde de carbone et 89% en azote) et les étuves deux gaz (6% en dioxyde de carbone, air équivalent à 20% en oxygène) que l'équipe de Waldenstrom a montré la supériorité des étuves trois gaz en terme de taux de blastocystes et donc l'intérêt d'une concentration réduite en oxygène au sein des étuves de culture (Waldenstrom et al. 2009).

➡ **Les étuves trois gaz avec une concentration réduite en oxygène améliorent le taux de blastocystes ainsi que leur qualité.**

- **Les milieux:**

La composition des milieux culture ainsi que certains paramètres sont importants à prendre en compte afin d'optimiser le taux de blastocystes.

**Le pyruvate et le glucose** utilisés dans les milieux de culture, sont des carbohydrates essentiels au développement embryonnaire. Le pyruvate est utilisé par l'embryon pour son métabolisme de base aux stades précoces du développement embryonnaire. Dès lors que l'embryon se compactera et passera du stade 8 cellules au stade 16 cellules, il utilisera de façon préférentielle du glucose afin de se développer jusqu'au stade blastocyste (Houghton et al. 1996).

En l'absence de glucose, l'embryon présentera un blocage de développement au stade morula (Brown et al. 1991).

**La glutamine** présente dans les milieux de culture à une dose supérieure à 1 mM produit, lors de son exposition à une température de 37°C, des ions ammonium (Gardner and Lane 1993 ; Lane and Gardner 2003). Ces derniers sont toxiques pour l'embryon et inhibent son développement jusqu'au stade blastocyste (Gardner and Lane 1993 ; Lane and Gardner 2003 ; Orsi and Leese 2004 ; Virant-Klun et al. 2006). Afin de minimiser leur production, il est possible d'utiliser un dipeptide stable de la glutamine tel que l'alanyl-glutamine et éviter d'exposer les milieux contenant de la glutamine à des températures élevées.

**Le pH** des milieux de culture est un paramètre important à contrôler et à maîtriser afin d'assurer le développement embryonnaire. Il est recommandé de maintenir un pH intracellulaire entre 7.2 et 7.3 (Baltz et al. 1991 ; Dale et al. 1998 ; Lane et al. 1998 ; Lane et Bavister 1999).

**L'osmolarité** des milieux est également un paramètre essentiel car sa stabilité permet le bon développement du zygote jusqu'au stade embryonnaire puis jusqu'au stade blastocyste (Li and Foote 1996 ; Hadi et al. 2005 ; Fong et al. 2007). Il est donc recommandé d'utiliser des pipettes normalement calibrées, de l'huile et de maintenir un environnement de culture humide à 37°C.

Actuellement, sur le marché, il existe deux types de milieux de culture recommandés pour la culture prolongée :

- les milieux séquentiels pour lesquels le changement de milieu est nécessaire à J2-J3 afin de placer les embryons dans un environnement riche en glucose permettant d'optimiser leur développement jusqu'au stade blastocyste. Le principal inconvénient est la nécessité de manipuler une nouvelle fois l'embryon.
- les milieux globaux, riches en pyruvate et glucose permettent d'éviter les changements de milieu à J2-J3 et sont d'utilisation récente.

 **Le type de milieu de culture et sa composition ont un impact sur les taux de blastocystes.**

## b) Activités du laboratoire

Le contrôle de certains paramètres lors de la manipulation des gamètes et la mise en fécondation permet d'optimiser le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste. De même, l'aspect morphologique à J2/J3 est une aide permettant d'anticiper le devenir biologique de l'embryon.

- ***La qualité des ovocytes:***

L'équipe de Catala a démontré que la qualité des ovocytes obtenus au cours de la ponction avait un impact sur le développement de l'embryon jusqu'au stade blastocyste, principalement sur le nombre de blastomères obtenues. Ceci serait secondaire à l'activation mitochondriale qui serait plus importante dans les ovocytes de meilleure qualité (Catala MG et al. 2012).

- ***La qualité du sperme :***

Avec la mise en place de l'ICSI au sein des centres d'Aide Médicale à la Procréation, la prise en charge des patients présentant des anomalies des paramètres spermatiques s'est largement développée. En effet, grâce à cette technique de fécondation, il est possible de prendre en charge des patients présentant des altérations spermatiques sévères ainsi que des patients présentant des azoospermies de type obstructive ou non obstructive en utilisant des spermatozoïdes obtenus au cours d'une biopsie testiculaire ou épидидymaire. Cependant, certaines études ont mis en évidence que le clivage embryonnaire, la qualité des embryons et le taux d'implantation étaient dépendants des paramètres paternels et donc que la sévérité des anomalies spermatiques pouvaient être en cause en cas d'altération de ces paramètres (Palermo et al. 1999). Cet effet paternel sur le développement embryonnaire interviendrait après l'activation génomique embryonnaire correspondant à la production des transcrits paternels (Asch et al. 1995). Le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste, indicateur de la qualité et de la viabilité embryonnaire, serait donc altéré en cas de paramètres spermatiques altérés.

L'équipe de Balaban a mis en évidence que l'augmentation des anomalies spermatiques diminuerait les taux de développement jusqu'au stade blastocystes, observation d'autant plus vraie que le sperme utilisé provient d'une biopsie testiculaire effectuée dans le cadre d'une azoospermie non obstructive (Balaban et al. 2001).

 **Des paramètres spermatiques très altérés ont un impact sur le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste.**

- ***La température de manipulation :***

Le maintien d'une température constante à 37°C est essentiel lors de la manipulation des ovocytes. En effet, une modification de cette température entraînerait des anomalies génétiques au sein des blastocystes, sans altérer sa morphologie (Lane M et al. 2008).

Il en est de même lors de l'observation quotidienne des embryons et des blastocystes pour définir leur aspect morphologique. Il est nécessaire que les microscopes utilisés soient munis de platines chauffantes afin que les embryons restent à une température d'environ 37°C en dehors de l'incubateur (Pickering et al. 1990 ; Kimmel et al. 2002).

➡ **Maintenir une température optimale de 37°C lors de la manipulation des gamètes et des embryons assure un meilleur développement des embryons.**

- ***La technique de fécondation :***

Actuellement, la Fécondation *In Vitro* classique et l'ICSI sont les deux techniques d'Aide Médicale à la Procréation utilisées en routine.

Certaines études ont mis en évidence que l'ICSI diminuerait le taux de blastocystes (Menezo et al.2000 ; Wilson et al.2002).

Cette observation a largement été controversée par d'autres études qui ne trouvaient pas de différence entre la fécondation *in vitro* classique et l'ICSI pour ce qui est du développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste (Zollner et al. 2002 ; Van Landuyt et al. 2005).

- ***L'aspect morphologique des embryons à J2/J3 :***

La morphologie des embryons à J2/J3 prédirait les compétences de développement jusqu'au stade blastocyste (Braga et al. 2014). Un embryon de bonne qualité à J2/J3 (4 cellules régulières avec peu de fragments) aurait plus de chance de se développer jusqu'au stade blastocyste et de devenir un blastocyste dit de « Top Qualité » (Guérif et al. 2010).

➡ **L'aspect morphologique embryonnaire à J2/J3 a un impact sur le développement jusqu'au stade blastocyste et sur la qualité des blastocystes.**

# 3- MATERIELS ET METHODES

### 3.1- Conditions de l'étude

Cette étude a été menée dans le service de Médecine et Biologie de la Reproduction de l'hôpital Bretonneau à Tours, entre janvier 2006 et décembre 2016. Durant cette période, nous avons collecté toutes les tentatives de FIV (FIV classique et ICSI) pour lesquelles toute la cohorte embryonnaire a été mise en culture prolongée. Depuis 2002, chaque embryon mis en culture prolongée est suivi individuellement jusqu'à J5 ou J6 et son devenir est observé à la fin des 6 jours de culture (transfert, congélation, élimination) ainsi que son devenir clinique en terme de grossesse clinique.

Le devenir biologique des embryons mis en culture prolongée à J2 a été évalué par la capacité individuelle à se développer au stade blastocyste. L'étude de l'aspect morphologique des embryons à J2 sur le développement embryonnaire a été effectuée sur 26857 embryons.

Par la suite, pour faciliter la comparaison des embryons entre eux et ainsi éviter certains biais, seuls les embryons d'aspect morphologique 411 à J2 ont été pris en compte comme embryon de référence (n=5462). Ces embryons nous ont permis d'évaluer l'impact de l'âge de la femme, de la technique de fécondation et l'origine du sperme, des milieux de culture prolongée utilisés et des conditions de culture physiques.

Le devenir clinique des blastocystes transférés à l'état frais a porté sur les cohortes embryonnaires totales mises en culture prolongée. Deux stratégies de transfert ont été évaluées :

- Le transfert de blastocystes uniques : 3221 cycles
- Le transfert de deux blastocystes : 940 cycles

Les résultats ont été établis en termes de taux d'implantation et de grossesses cliniques par ponction.

La stratégie du nombre de blastocystes transférés au stade blastocyste a été étudiée en évaluant l'âge de la femme, le rang de la ponction et l'aspect morphologique de la cohorte J5/J6.

La stratégie de transfert à J5/J6 versus J2 a été comparée en prenant en compte le nombre et l'aspect des embryons mis en culture prolongée à J2.

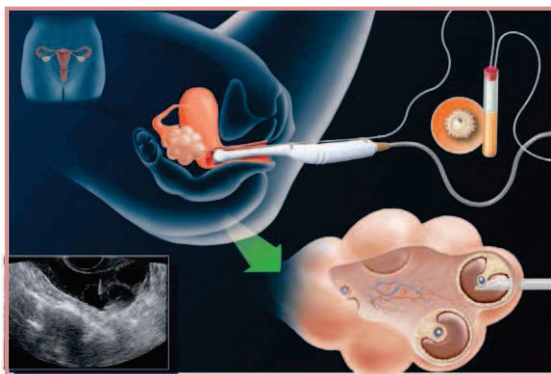
## 3.2- Conditions au laboratoire

### 3.2.1- La mise en fécondation

#### a) Le recueil ovocytaire

Le protocole de stimulation ovarienne débute par un blocage de l'ovulation avec de la triptoréline (0,1 mg en sous cutanée de Decapeptyl ; Ipsen-Biotech Laboratories, Paris, France). Puis un traitement par FSH recombinante (rFSH) est initié afin de stimuler le développement folliculaire (Follitropin alpha, Gonalf ; Serono Laboratories, Geneva, Switzerland ou Puregon ; Organon ; Pharmaceuticals, Saint-Denis, France). La surveillance est mise en place par un monitoring incluant une échographie pelvienne intra-vaginale et une mesure dans le sérum des concentrations en œstradiol, LH et progestérone. Le déclenchement de l'ovulation par injection d'hCG (5000 ou 10000 IU, i.m. Gonadotrophine Chorionique Endo ; Organon Pharmaceuticals) est décidé lorsqu'il est obtenu au moins 3 follicules d'un diamètre supérieur à 18 mm associés à des concentrations en œstradiol supérieur à 300 pg/ml par follicule mature.

La ponction folliculaire écho-guidée s'effectue 34 à 36 heures après l'injection d'hCG (cf figure 4). Le liquide folliculaire est réceptionné directement au laboratoire afin de procéder au recueil ovocytaire. Celui-ci s'effectue sous hotte, à 37°C (cf figure 5). Les ovocytes recueillis sont placés dans une boîte 4 puits contenant 800 microlitres de milieu de culture (GIVF ; VITROLIFE) puis rangés dans un incubateur à 37°C sous 6% de CO<sub>2</sub>, 5% d'O<sub>2</sub> et 89% de N<sub>2</sub>.



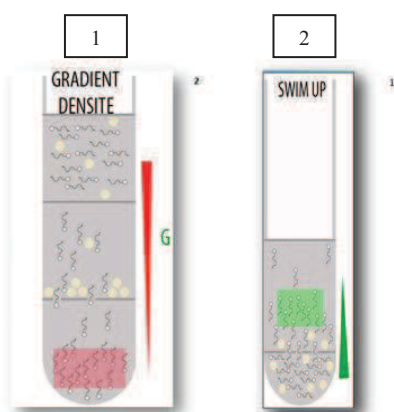
**Figure 4** : Ponction folliculaire écho-guidée.



**Figure 5** : Equipements nécessaire au recueil ovocytaire au sein du laboratoire.

## b) La préparation du sperme

La préparation du sperme s'effectue au laboratoire sous hotte. Après réception, le sperme est placé entre 30 minutes et 1 heure dans une étuve à 37°C afin de permettre sa liquéfaction. Une analyse des paramètres spermatiques est ensuite effectuée (volume, pH, mobilité, concentration). Nous utilisons au sein de notre laboratoire la technique du gradient de densité (90% et 45% de milieu Sperm grad) afin de sélectionner les spermatozoïdes mobiles progressifs. Lorsqu'une FIV classique est décidée, un swim up ou migration ascendante est également effectué (cf figure 6).



**Figure 6 :** Technique du gradient de densité (1) et technique du swim up (2).

## c) La fécondation

La mise en fécondation s'effectue à J0.

**La FIV classique** consiste à mettre en contact, dans un même puit, la cohorte ovocytaire et des spermatozoïdes mobiles progressifs. Pour cela, des boîtes 4 puits sont utilisées (cf figure 7). Chaque puit contient 800 microlitre de milieu de culture. Les ovocytes recueillis seront déposés dans les 2 premiers puits puis seront ajoutés environ 75 000 spermatozoïdes mobiles progressifs par puit. En milieu de journée, les ovocytes seront transférés dans les puits 3 et 4 afin d'éviter que les radicaux libres libérés par les spermatozoïdes ne soient délétères pour les ovocytes.



**Figure 7 :** Boîte 4 puits utilisée pour la mise en fécondation en FIV classique.

L'**ICSI** consiste en l'injection intra-cytoplasmique d'un spermatozoïde dans un ovocyte mature (cf figure 8).



**Figure 8 :** Mise en fécondation par la technique d'ICSI.

Cette technique est précédée d'une étape de décoronisation permettant de libérer l'ovocyte des cellules du cumulus et ainsi de différencier les ovocytes matures (possédant un globule polaire) des ovocytes immatures (absence de globule polaire) (cf figure 9).



**Figure 9 :** Ovocyte mature (1), ovocyte immature avec vésicule germinale (2), ovocyte immature (3).

Cette étape repose sur une décoronisation d'abord enzymatique par l'intermédiaire de la hyaluronidase puis d'une décoronisation mécanique. Seuls les ovocytes matures seront injectés.

Les zygotes obtenus à J1 après une FIV classique ou les ovocytes injectés à J0 lors d'une ICSI sont placés dans des microgouttes de 25 microlitres, individuellement, sous huile minérale puis les boîtes sont placées dans des incubateurs et mis en culture à 37°C sous 6% de CO<sub>2</sub>, 5% d'O<sub>2</sub> et 89% de N<sub>2</sub>.

### 3.2.2- Les milieux de culture prolongée

Entre 2006 et 2016, différents milieux de culture prolongée ont été utilisés au sein de notre centre.

Les milieux séquentiels sont utilisés depuis 2006 :

- COOK (Brisbane, Australie): Milieu IVF Blastocyst Medium (2007-2013)
- MEDICULT (Copenhague, Danemark): Milieu Blast Assist (2007)
- VITROLIFE (Goteborg, Suède): Vitrolife Serie G (2006/2014-2016)

Les milieux uniques sont utilisés depuis 2015 :

- VITROLIFE: Milieu GTL (2015-2016)
- ORIGIO: Milieu Sage (2015-2016)

### 3.2.3- La mise en culture prolongée

A partir de J2 et jusqu'à J5/J6, les embryons sont placés dans des microgouttes de 25 microlitres de milieu de culture prolongée sous huile minérale. Les boîtes sont ensuite placées dans des incubateurs à 37°C sous 6% de CO<sub>2</sub>, 5% d'O<sub>2</sub> et 89% de N<sub>2</sub>.

### 3.2.4- Les incubateurs

Au sein de notre centre, sur la période 2006-2016, 2 types d'incubateurs ont été utilisés dans 3 conditions différentes. Tous nos incubateurs sont alimentés avec 6% de CO<sub>2</sub>, 5% d'O<sub>2</sub> et 89% de N<sub>2</sub> (système 3 gaz ou pré-mélange). Leur température est de 37°C.

#### • Incubateur 150L 3 gaz sans caméra

Ce type d'incubateur était utilisé pour la culture prolongée de façon exclusive jusqu'en décembre 2006 puis de façon alternée avec les autres incubateurs entre 2012 et 2013.

Son principal inconvénient repose sur son ouverture fréquente au cours de la matinée du fait de ses utilisations multiples pour le recueil ovocytaire, la préparation du sperme et les observations. Actuellement, nous l'utilisons principalement pour la culture embryonnaire jusqu'à J2.

- Incubateur 150L 3 gaz équipé de caméras

Cet incubateur a été équipé de 6 caméras permettant de filmer le développement embryonnaire de J0 à J5/J6 (cf figure 10). Ces 6 caméras sont reliées à un ordinateur qui retranscrit les images. Chaque caméra est placée au dessus d'une boîte pouvant contenir jusqu'à 9 embryons. L'observation des embryons se fait donc sans sortir les boîtes de l'incubateur, empêchant toute modification de température ou d'environnement. Il a été mis en place en 2013. Actuellement, il est utilisé en alternance avec les K MINK pour la culture prolongée.



**Figure 10** : Caméras permettant d'équiper les incubateurs 150L.

- Mini incubateur K MINK

Les K MINK sont de petits incubateurs mis en place en janvier 2007 (cf figure 11). Ils ont été utilisés de façon exclusive pour la culture prolongée jusqu'en septembre 2012 puis de façon alternée avec les autres incubateurs, d'abord avec l'incubateur 150L sans caméra jusqu'en juin 2013 puis avec l'incubateur 150L avec caméras encore actuellement. Ils sont de petite taille et peuvent contenir 4 boîtes de 4 puits, 4 boîtes de 12 puits et jusqu'à 12 boîtes de culture prolongée rondes. Nous possédons 2 incubateurs K MINK dédiés à la culture prolongée K5 et K6.



**Figure 11** : Mini incubateur K MINK.

### 3.2.5- L'observation morphologique précoce

Les lectures sont réalisées au microscope inversé aux grossissements x200 et x400.

La fécondation est évaluée 18 à 20 heures après l'insémination en FIV classique ou l'injection en ICSI. Les paramètres étudiés sont la présence ou non des Pronuclei (PN) et le nombre de globules polaires (GP).

Il y a fécondation dès lors qu'il est observé 2 PN et 2 GP. Un ovocyte est considéré comme mature lorsqu'il a expulsé son premier GP.

A J2, les embryons sont observés 44 à 46 heures après l'insémination en FIV classique ou l'injection en ICSI. L'évaluation de l'aspect morphologique des embryons repose sur différents critères permettant d'établir un score morphologique.

Ce score permet de décider du devenir de l'embryon (transfert, congélation, culture prolongée, élimination).

Trois critères principaux sont observés : le nombre de cellules, la régularité des cellules et la proportion de fragments cytoplasmiques.

- *Le nombre de cellules*

Le nombre de cellule est évalué par le compte du nombre de blastomères de l'embryon à J2 (cf figure 12).



**Figure 12:** Embryon à 2 blastomères (1), embryon à 3 blastomères (2), embryon à 4 blastomères (3).

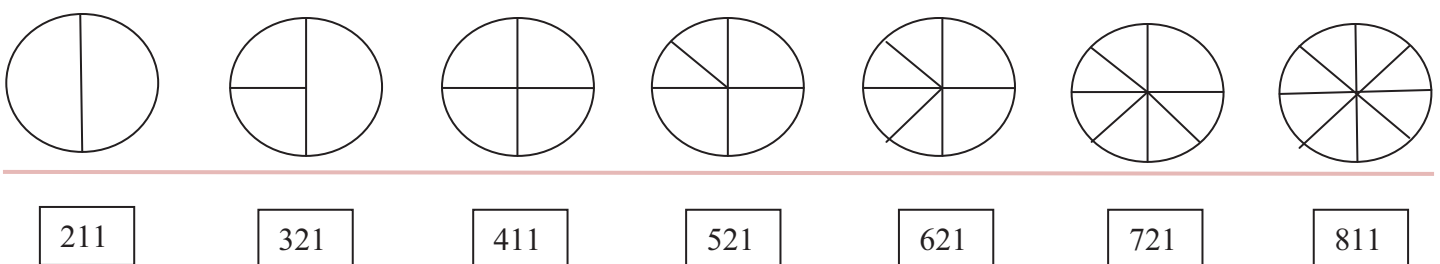
- *La régularité des cellules*

La régularité des cellules est évaluée en observant la taille des cellules (cf **figure 13**). Lorsque les cellules ont une taille équivalente entre elles, nous qualifierons l'embryon avec le chiffre 1. Dans le cas contraire, nous qualifierons l'embryon avec le chiffre 2.



**Figure 13:** Embryon régulier (1), embryon irrégulier (2).

Un embryon présentant une chronologie de développement correcte ne possède pas obligatoirement des cellules de même taille. En effet, un embryon en cours de division possèdera des cellules de taille différente, certaines plus petites car la division s'est déjà produite, d'autres plus grandes car la division est en cours (cf **figure 14**). Ce critère est important à prendre en compte et sera mis en avant dans la suite de l'étude avec une qualification de « Régulier » lorsque les cellules ont une régularité concordante avec le stade de développement et « Non régulier » lorsque l'aspect des cellules ne correspond pas à la chronologie.



**Figure 14 :** Evolution chronologique normale d'un embryon à J2 en ce qui concerne la régularité de ses cellules .

- *La proportion de fragments cytoplasmiques*

La proportion de fragments cytoplasmiques est également observée à J2 et exprimée en pourcentage de fragments cytoplasmiques présents au sein de l'embryon.

Un embryon présentant un taux de fragmentation de moins de 10% sera qualifié du chiffre 1, du chiffre 2 entre 10% et 50% et du chiffre 3 au-delà de 50% (cf figure 15).



**Figure 15 :** Embryon possédant moins de 10% de fragments cytoplasmiques (1), embryon possédant entre 10 et 50% de fragments cytoplasmiques (2), embryon possédant plus de 52% de fragments cytoplasmiques (3).

L'évaluation nucléaire est également importante pour la prise de décision. Un score nucléaire anormal entraînera l'élimination de l'embryon.



Cellule multinucléée



Score nucléaire normal

Selon cette classification, un embryon est considéré comme « Top Qualité » lorsqu'il présente un aspect de type 411 à J2 soit 4 cellules régulières avec moins de 10% de fragments. Il sera pris comme embryon de référence dans l'analyse des résultats.



### 3.2.6- L'observation morphologique tardive

Le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste est évalué à J5 puis à J6. Une description morphologique du blastocyste est effectuée selon la classification de Gardner. Gardner et Schoolcraft ont identifiés 3 paramètres morphologiques permettant de décrire les blastocystes (Gardner DK et al. 1999). Une classification a été établie, regroupant ces 3 paramètres et pouvant être une aide pour la sélection des blastocystes à transférer et à congeler. En effet, il a été mis en évidence une corrélation entre l'aspect morphologique des blastocystes à J5 et leur taux d'implantation (Gardner et al. 2000 ;cf tableau 1).

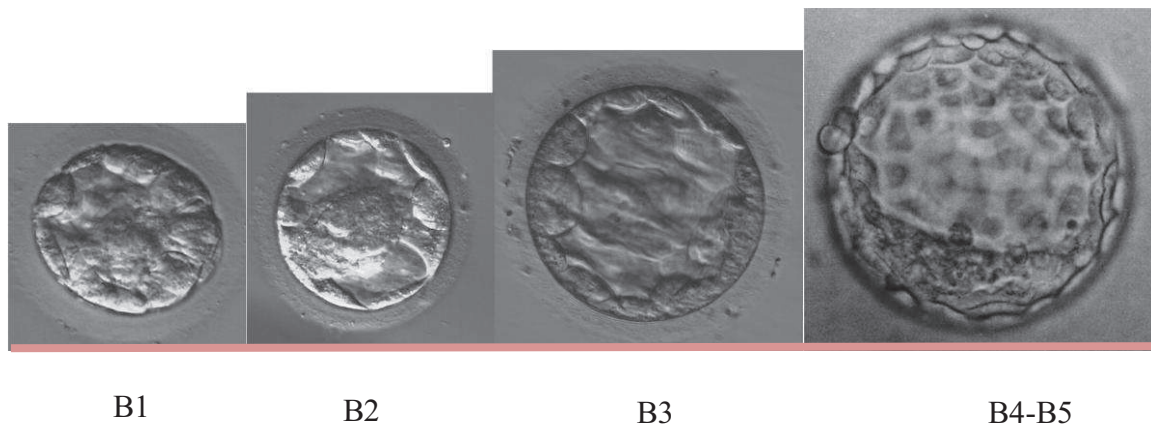
Ces 3 paramètres sont :

- le degré d'expansion du blastocèle
- la taille et la compaction de la masse cellulaire interne (MCI)
- la cohésion et l'aspect du trophoctoderme (TE)

Degré d'expansion du blastocèle	B1	Blastocyste non expansé Blastocèle < 50% du volume de l'embryon
	B2	Blastocyste non expansé 50% ≤ Blastocèle < 100% du volume de l'embryon
	B3	Blastocyste non expansé Blastocèle = 100% du volume de l'embryon
	B4	Blastocyste expansé Amincissement de la zone pellucide
	B5	Blastocyste expansé en cours d'éclosion Rupture de la zone pellucide
	B6	Blastocyste éclos Séparation de la zone pellucide et du blastocyste
Aspect des cellules de la masse cellulaire interne (B3-B6)	A	Cellules regroupées à un pôle du blastocyste
	B	Cellules éparées
	C	Absence de regroupement cellulaire
Aspect des cellules du trophoctoderme (B3-B6)	A	Cellules formant un épithélium régulier
	B	Cellules formant un épithélium irrégulier
	C	Épithélium lisse, irrégulier, pauvre en cellules

**Tableau 1** : Caractéristiques morphologiques des blastocystes selon les critères établis par Gardner et Schoolcraft (Gardner et al. 1999).

Selon cette classification, un blastocyste est considéré comme étant de « Top qualité » lorsqu'il présente un aspect B3 à B6 à J5 avec un trophectoderme de type A ou B et une masse cellulaire interne de type A ou B.



**Figure 16 :** Les différents stades d'expansion d'un blastocyste.

Lorsque l'embryon n'a pas atteint le stade blastocyste à J5, il est conservé un jour de plus pour une nouvelle observation à J6.

### 3.2.7- Le transfert

Le blastocyste transféré doit présenter le degré d'expansion le plus élevé de la cohorte de blastocystes obtenue avec la meilleure masse cellulaire interne et trophectoderme. Le transfert se fera préférentiellement à J5, cependant, lorsqu'aucun blastocyste n'est obtenu à J5, le transfert peut éventuellement être reporté à J6. Si aucun embryon n'atteint le stade de blastocyste à J6, le transfert est annulé.

La stratégie de transfert de blastocystes dans notre centre prend en compte deux critères principaux : l'âge de la femme et le rang de la ponction.

Un transfert de blastocyste unique est recommandé lorsque la femme est âgée de moins de 37 ans et qu'elle bénéficie de sa première ou seconde ponction.

Un transfert de deux blastocystes est recommandé lorsque la femme est âgée de 37 ans ou plus ou que la femme bénéficie de sa troisième ou quatrième ponction.

### 3.2.8- Le suivi

Le dosage sérique d'hCG est réalisé 7 jours après le transfert. En cas de positivité, un second dosage sérique est pratiqué à 48h afin d'évaluer son évolution. Une grossesse est considérée comme clinique dès que le dosage sérique est supérieur à 1000 UI/L.

Une échographie est effectuée une semaine après le troisième dosage afin de visualiser le ou les sacs gestationnels ainsi que la présence ou non d'une activité cardiaque. Le taux d'implantation est le rapport entre le nombre de sacs gestationnel sur le nombre d'embryons transférés.

### 3.3- Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Statview 4.1 (Abacus Concepts, Berkeley, Etats-Unis). Les paramètres quantitatifs ont été réalisés avec le test  $t$  de Student. Les paramètres qualitatifs ont été analysés sous forme de tableau de contingence à l'aide du test du  $X^2$ . Le seuil de significativité était fixé à 5%.

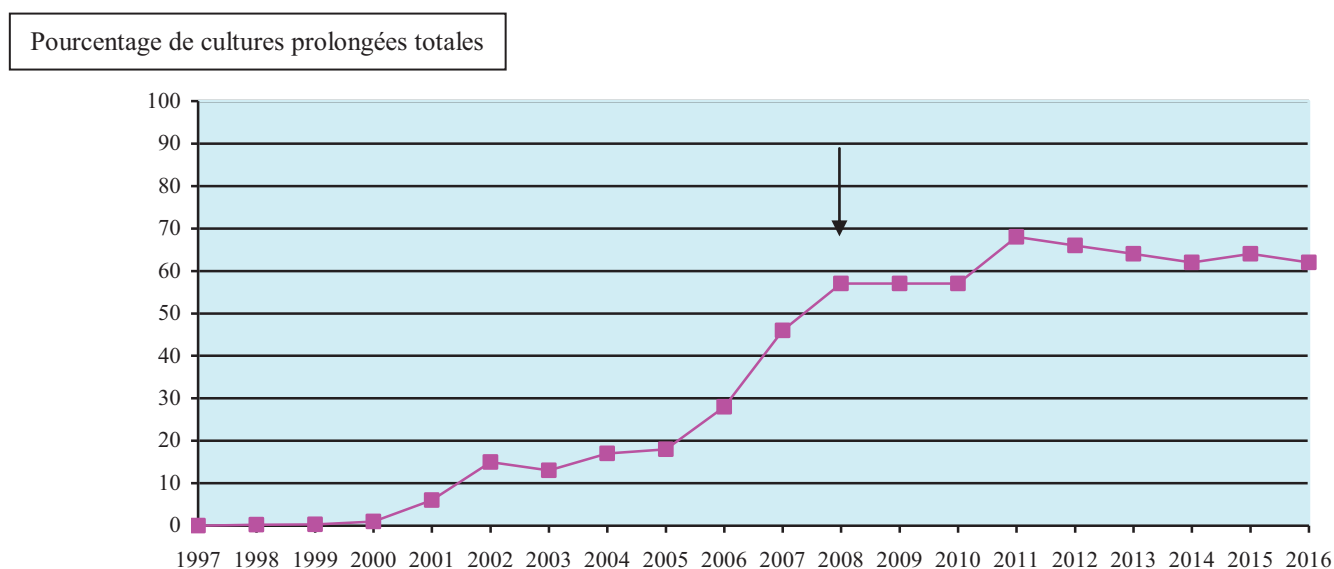
## 4- RESULTATS

## 4.1- Evolution des pratiques

### 4.1.1- Evolution globale de la mise en culture prolongée des cohortes totales embryonnaires

La culture prolongée a été instaurée dans le centre à la fin des années 90. A son origine, elle concernait des cohortes embryonnaires partielles afin d'évaluer la capacité de développement jusqu'au stade blastocyste des embryons surnuméraires (ni transférés, ni congelés) et de permettre éventuellement leur congélation à ce stade tardif. Elle s'est progressivement développée et concerne actuellement majoritairement les cohortes embryonnaires totales afin de permettre aussi un transfert frais au stade blastocyste.

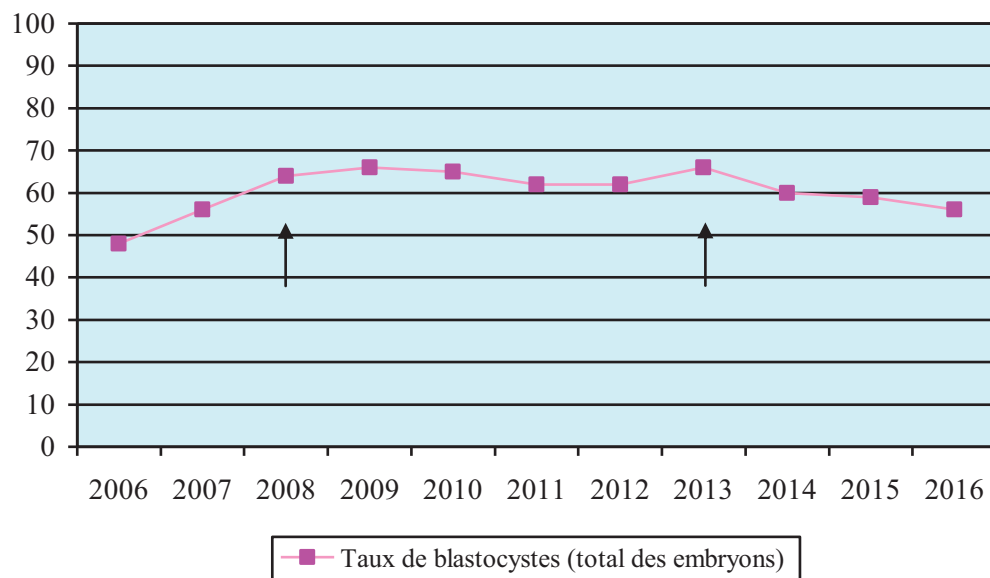
La mise en culture prolongée de cohortes embryonnaires totales a présenté une évolution progressivement croissante depuis la fin des années 90 avec une fréquence comprise entre 60 et 70% environ depuis 2008 (cf **figure 17**).



**Figure 17 :** Evolution de la mise en culture prolongée des cohortes totales dans le centre entre 1997 et 2016.

#### 4.1.2- Evolution du taux de blastocystes

Le taux de blastocystes obtenu après culture embryonnaire prolongée sur cohorte totale, quelle que soit la qualité embryonnaire à J2 a augmenté entre 2006 et 2008 passant de 48% à 64%, respectivement. Il s'est stabilisé entre 2008 et 2013 avec un taux d'environ 65% avec une légère diminution en 2016 (56%) (cf **figure 18**).



**Figure 18 :** Evolution du taux de blastocyste de l'ensemble des embryons mis en culture prolongée entre 2006 et 2016.

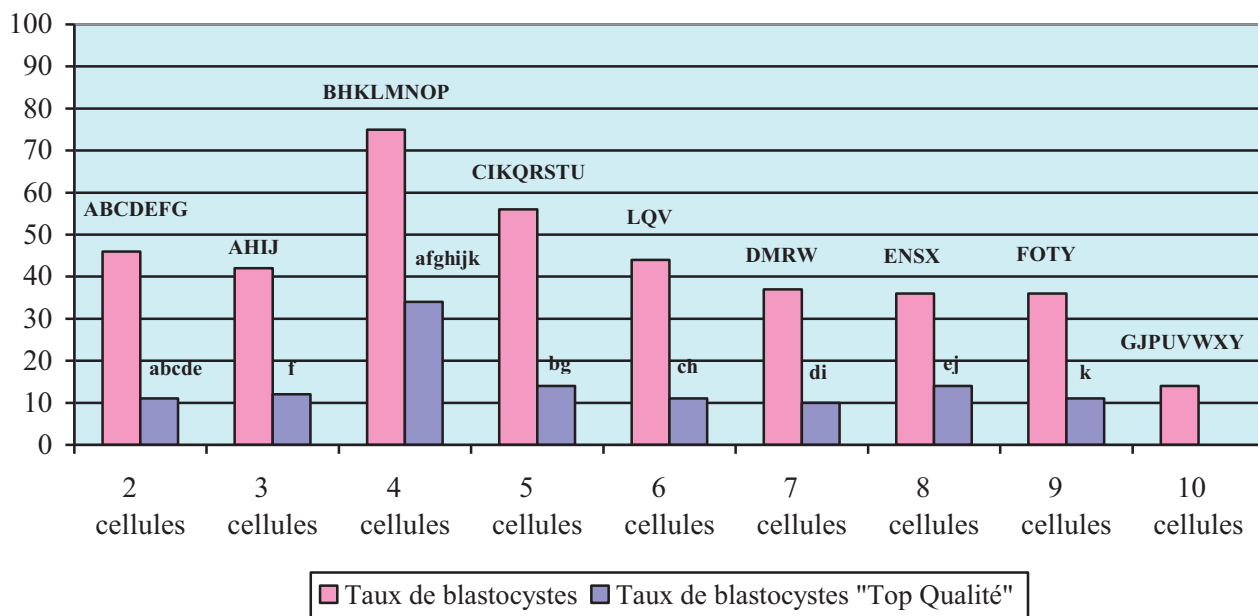
## 4.2- Facteurs influençant le développement au stade blastocyste

### 4.2.1- Influence de la morphologie embryonnaire à J2

#### a) Nombre de cellules à J2

Le nombre de blastomères présents à J2 a un impact sur la capacité de développement de l'embryon au stade blastocyste ainsi que sur son aspect morphologique (cf **figure 19**).

En effet, un embryon avec 4 cellules à J2 a significativement plus de chance de se développer au stade blastocyste (75% ;  $p < 0,0001$ ) et donner un blastocyste « Top Qualité » (34% ;  $p < 0,0001$ ).

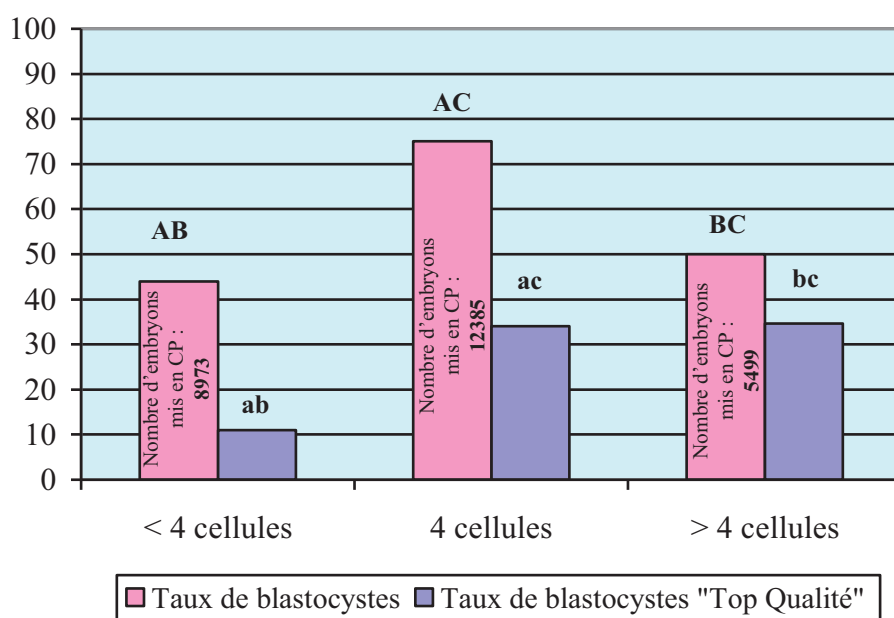


**Figure 19** : Taux de blastocyste et taux de blastocyste « Top Qualité » en fonction du nombre de cellules à J2. Les colonnes présentant des lettres identiques ont des résultats significativement différents entre elles ( $p < 0,05$ ).

Les embryons ont ensuite été regroupés en 3 classes. Au regard des résultats précédents, les embryons possédant 4 cellules à J2 ont été pris comme groupe de référence et comparés à des embryons plus lents (2-3 cellules) ou plus rapides (5 cellules et plus).

Les embryons avec 4 cellules à J2 ont la probabilité la plus élevée de se développer au stade blastocyste (75%) et de présenter un aspect « Top Qualité » (34%) ( $p < 0,0001$ ).

Ensuite, ce sont les embryons avec une cinétique plus rapide (5 cellules et plus) qui ont significativement plus de chance de se développer à ce stade (50%) et d'évoluer en un blastocyste de « Top qualité » (36%) par rapport aux embryons lents (2-3 cellules) (44% et 11%, respectivement) (cf **figure 20**).



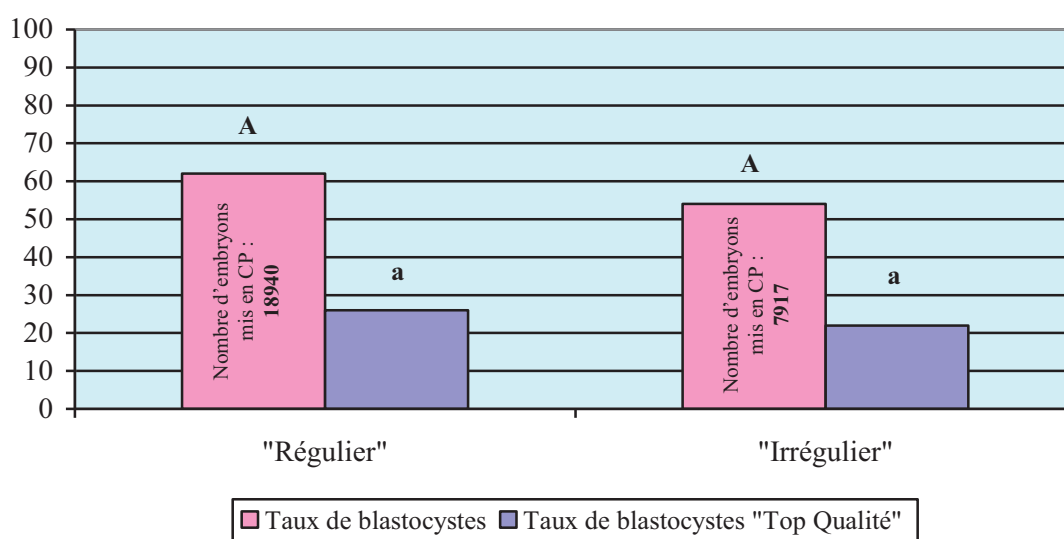
**Figure 20** : Taux de blastocystes et de blastocystes « Top Qualité » en fonction du nombre de cellules regroupés en 3 classes à J2. Les colonnes présentant des lettres identiques ont des résultats significativement différents entre elles ( $p < 0,05$ ). CP = culture prolongée.

La cinétique de développement à J2 est un critère discriminant sur la capacité de développement au stade blastocyste.

## b) Régularité des cellules à J2

La régularité en taille des cellules à J2 est normalement influencée par le nombre de blastomères à un stade précis. Nous avons donc considéré qu'un embryon à J2 était « régulier » lorsque la taille des cellules était concordante avec le nombre de cellules (cf section matériel et méthode).

Les embryons dits « réguliers » à J2 ont significativement plus de chance de se développer au stade blastocyste que les embryons dits « irréguliers » (62% vs 54%, respectivement ;  $p < 0,0001$ ) et de donner un blastocyste « Top Qualité » (26% versus 22%,  $p < 0,0001$ ; cf **figure 21**).



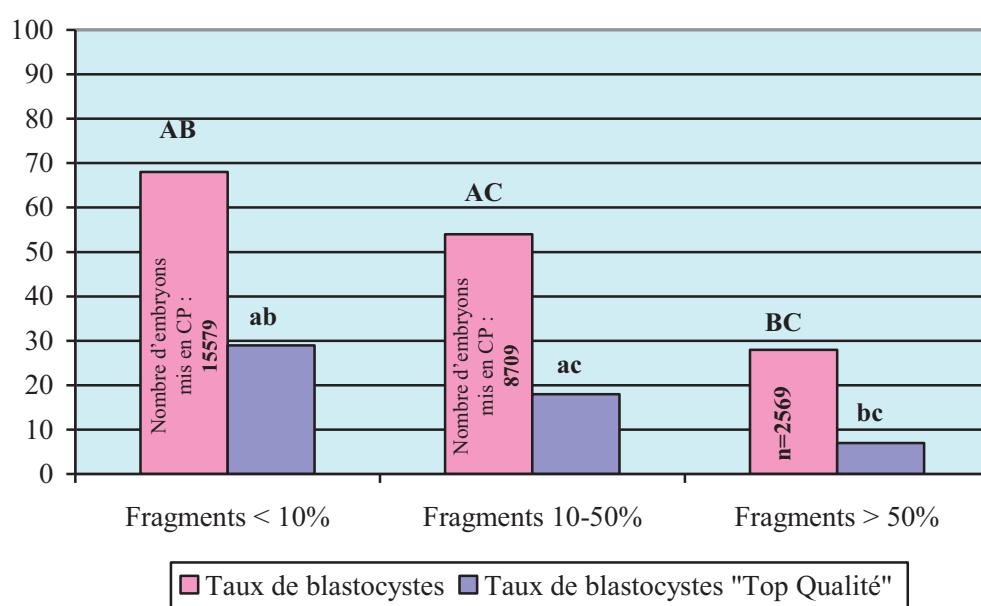
**Figure 21** : Taux de blastocystes et taux de blastocystes « Top Qualité » en fonction de la régularité des cellules à J2. CP = culture prolongée.

La régularité des cellules embryonnaires à J2 en fonction du nombre de blastomères est un critère influençant la capacité de développement au stade blastocyste.

### c) Taux de fragmentation à J2

La probabilité de développement au stade blastocyste est d'autant plus élevée que le taux de fragmentation est faible (68% en cas de rares fragments cytoplasmiques contre 28% en cas de nombreux fragments cytoplasmiques ;  $p < 0,0001$ ).

L'observation est identique en considérant le taux de blastocystes « Top Qualité » (29% versus 7% ; cf **figure 22**).



**Figure 22** : Taux de blastocystes et de blastocystes « Top Qualité » en fonction de la proportion de fragments cytoplasmiques à J2. Les colonnes présentant des lettres identiques ont des résultats significativement différents entre elles ( $p < 0,05$ )  
CP = culture prolongée.

La proportion de fragments cytoplasmiques présents à J2 a un impact sur le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste.

#### d) Caractéristiques morphologiques globales (code à 3 chiffres)

Les embryons observés à J2 sont classés selon un code prenant en compte le nombre et la régularité des cellules ainsi que la proportion de fragments cytoplasmiques (cf section matériel et méthodes).

Les embryons dit de « Top qualité » à J2 (ayant un code morphologique de 411) ont la capacité la plus élevée de développement jusqu'au stade blastocyste (85%) par rapport à tous les autres aspects morphologiques à J2 (cf **tableau 2**).

A l'inverse et en considérant uniquement les groupes avec un effectif suffisant ( $\geq 50$ ), les embryons ayant la probabilité la plus faible d'atteindre le stade blastocyste (18%) possèdent le code 223 et 623, c'est-à-dire en retard ou en avance en terme de cinétique et avec un taux élevé de fragments cytoplasmiques.

Les embryons de « Top Qualité » à J2 ont aussi la capacité la plus élevée d'évoluer en blastocyste « Top Qualité » (40%) par rapport à tous les autres aspects morphologiques à J2.

En considérant encore uniquement les groupes ayant un effectif suffisant ( $\geq 50$ ), les embryons ayant la probabilité la plus faible ( $< 5\%$ ) d'évoluer en blastocyste de « Top Qualité » possèdent le code 223, 622 et 722.

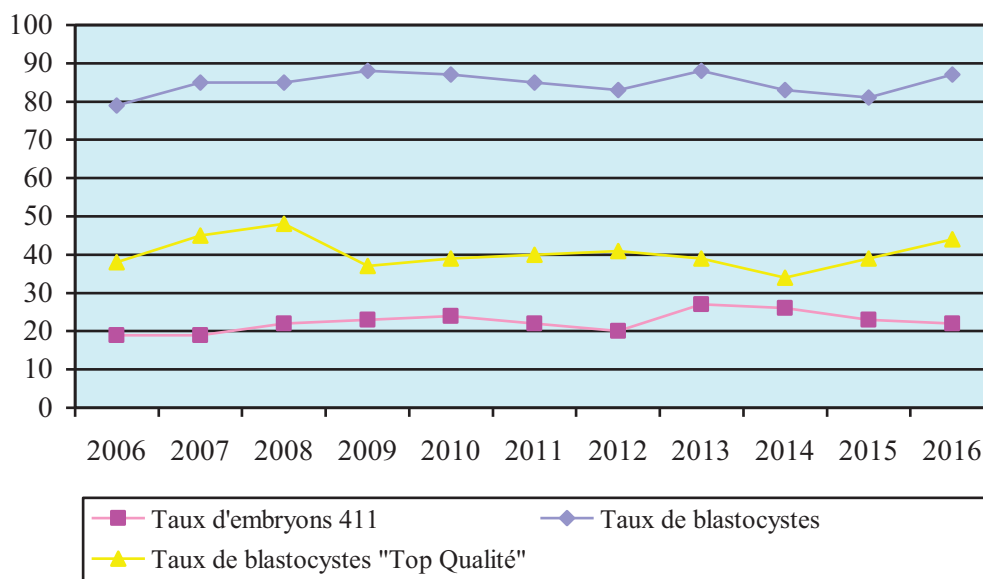
Les embryons présentant le code morphologique 411 ont la plus grande capacité de développement au stade blastocyste (85%) avec 40% de probabilité d'évoluer en blastocyste « Top Qualité ». Dans la suite de notre étude, les embryons de type 411 seront pris comme « groupe de référence » (cf **figure 23**).

Par contre, les embryons ayant la probabilité la plus faible d'atteindre le stade blastocyste (18%) et de donner un blastocyste « Top Qualité » (1 à 8%) sont les embryons avec une cinétique réduite ou accélérée associée à des blastomères irréguliers et un taux élevé de fragmentation (code 223 ou 623).



**Figure 23** : Embryon de « référence » présentant un code morphologique de 411.

Le taux de blastocystes pour les embryons 411 est globalement constant depuis 2006 (cf **figure 24**).



**Figure 24 :** Evolution du taux d'embryons de type 411, de blastocystes et de blastocystes « Top Qualité » pour les embryons 411 mis en culture prolongée entre 2006 et 2016.

Code	Nombre d'embryons en culture prolongée	Nombre de blastocystes (J5/J6)	Taux de blastocystes	Taux de blastocystes « Top Qualité »
211	2120	1134	53%	14%
212	1154	585	51%	11%
213	224	83	37%	5%
221	862	371	43%	10%
222	635	243	38%	5%
223	394	72	18%	1%
311	187	72	39%	15%
312	177	82	46%	14%
313	55	21	38%	9%
321	1373	691	50%	14%
322	1134	442	39%	8%
323	658	181	28%	5%
411	5462	4639	85%	40%
412	1871	1521	81%	32%
413	105	67	64%	21%
421	2785	2050	74%	30%
422	1639	890	54%	19%
423	523	146	28%	8%
511	174	133	76%	15%
512	102	71	70%	15%
(513)	(5)	(4)	(80%)	(0%)
521	1485	964	65%	18%
522	1184	589	50%	10%
523	356	102	29%	8%
611	111	39	35%	33%
(612)	(33)	(19)	(58%)	(5%)
(613)	(4)	(0)	(0%)	(0%)
621	633	355	56%	14%
622	564	230	41%	4%
623	218	40	18%	8%
(711)	(29)	(10)	(34%)	(45%)
(712)	(5)	(1)	(20%)	(0%)
(713)	(1)	(0)	(0%)	(0%)
721	209	85	41%	9%
722	125	44	35%	2%
723	(22)	(3)	(14%)	(0%)
811	(27)	(14)	(52%)	(27%)
(812)	(8)	(5)	(63%)	(67%)
821	98	39	40%	10%
822	70	16	23%	6%
(823)	(4)	(0)	(0%)	(0%)
(911)	(1)	(1)	(100%)	(0%)
(921)	(18)	(7)	(39%)	(14%)
(922)	(6)	(1)	(17%)	(0%)
(1021)	(5)	(1)	(20%)	(0%)
(1022)	(2)	(0)	(0%)	(0%)

**Tableau 2 :** Taux de blastocystes et de blastocystes « Top Qualité » en fonction de l'aspect morphologique de l'embryon à J2.  
Valeurs entre parenthèses = effectifs < 50.

## 4.2.2- Influence de l'âge de la femme

### a) Résultats globaux

Entre 2006 et 2016, dans notre centre, la fréquence d'embryons de type 411 à J2 se situe aux alentours de 20% quel que soit l'âge de la femme.

Les embryons de type 411 de femmes âgées de moins de 37 ans ont une probabilité similaire (entre 84% et 90%) de se développer au stade blastocyste (cf tableau 3).

A partir de 38 ans, ce taux a tendance à diminuer (77%) sans différence significative cependant.

Le taux de blastocystes « Top Qualité » n'est pas significativement modifié par l'âge des femmes, variant entre 34% et 47%.

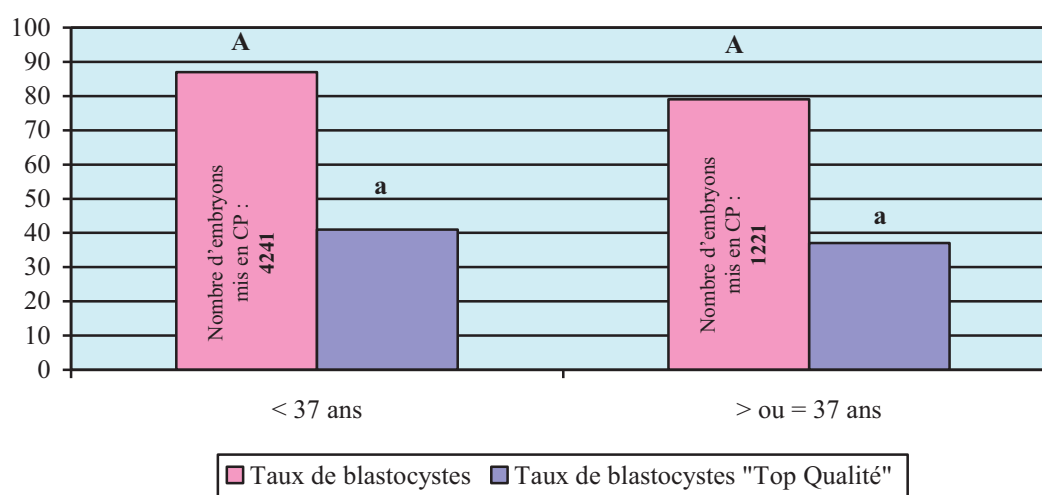
	Taux de 411	Nombre de 411 en culture prolongée	Taux de blastocystes	Taux de blastocystes « Top Qualité »
< 25 ans	20%	286	85%	39%
26 ans	21%	172	84%	41%
27 ans	23%	272	84%	47%
28 ans	20%	296	84%	36%
29 ans	21%	348	90%	38%
30 ans	18%	361	87%	40%
31 ans	21%	402	88%	45%
32 ans	21%	440	85%	43%
33 ans	20%	450	88%	42%
34 ans	18%	383	87%	39%
35 ans	21%	426	85%	39%
36 ans	22%	405	87%	43%
37 ans	20%	334	83%	37%
38 ans	20%	264	77%	44%
≥ 39 ans	22%	623	78%	34%

**Tableau 3 : Taux de blastocystes et de blastocystes « Top Qualité » en fonction de l'âge des femmes.**

## b) Seuil de 37 ans

Notre stratégie de transfert embryonnaire est différente au seuil de 37 ans, c'est pourquoi deux classes d'âge ont été définies : < 37 ans et  $\geq$  37 ans.

Les embryons de type 411 des femmes de moins de 37 ans ont significativement plus de chance de se développer en blastocyste (87% ;  $p < 0,0001$ ) et de présenter un aspect « Top Qualité » (41% ;  $p = 0,02$ ) que les embryons de type 411 des femmes de 37 ans et plus (79% et 37%, respectivement ; cf **figure 25**).



**Figure 25 :** Développement des embryons de type 411 au stade blastocyste et taux de blastocystes « Top Qualité » en fonction de l'âge de la femme.

Les colonnes présentant des lettres identiques ont des résultats significativement différents entre elles ( $p < 0,05$ ).  
CP = culture prolongée.

A partir de 37 ans, l'âge des femmes semble influencer le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste ainsi que l'aspect morphologique des blastocystes obtenus.

#### 4.2.3- Influence de la technique de fécondation et de l'origine du sperme

Trois origines du sperme ont été distinguées :

- sperme éjaculé de donneur fertile (FIV-D ou ICSI-D)
- sperme éjaculé de conjoint (FIV ou ICSI)
- sperme testiculaire ou épидидymaire de conjoint (ICSI-chir)

Dans cette partie de l'étude, nous considérons seulement les femmes de moins de 37 ans.

Les meilleurs taux de blastocystes et de blastocystes « Top Qualité » sont observés en FIVD c'est-à-dire avec un sperme fécondant et la technique de fécondation la moins invasive (cf Tableau 4).

Les taux les plus faibles de blastocystes et de blastocystes « Top Qualité » sont observés en ICSIchir, c'est-à-dire avec le sperme le plus altéré et la technique de fécondation la plus invasive.

En ne considérant que la technique de fécondation par FIV classique, les taux de blastocystes et de blastocystes « Top Qualité » ne sont pas significativement différents ( $p=0,34$  et  $p=0,49$ ) entre un sperme provenant d'un don (91% et 46%, respectivement) et un sperme éjaculé (88% et 42%, respectivement).

 **Peu en faveur d'un facteur paramètre spermatique.**

En ne considérant que la technique de fécondation par ICSI, les taux de blastocystes ne sont pas significativement différents entre un sperme éjaculé (86%), un sperme provenant d'un don (84%) et un sperme provenant d'une biopsie testiculaire (81%). En revanche, le taux de blastocystes « Top Qualité » est significativement plus élevé lorsque le sperme provient d'un don (44%) que lorsqu'il provient d'une biopsie testiculaire (31% ;  $p=0,08$ ).

 **En faveur d'un effet origine du sperme.**

En ne considérant que les spermatozoïdes provenant d'un don, les taux de blastocystes et de blastocystes de « Top Qualité » ne sont pas significativement différents entre une technique de fécondation par FIV classique et une technique de fécondation par ICSI.

 **Peu en faveur d'un effet technique de FIV.**

Age femme	Technique	Taux d'embryons 411	Nombre d'embryons 411 en culture prolongée	Taux de blastocystes	Taux de blastocystes « Top Qualité »
< 37 ans	FIVD	22%	123	91%	46%
	ICSID	20%	81	84%	44%
	FIV éjaculé	22%	1470	88%	42%
	ICSI éjaculé	19%	2424	86%	41%
	ICSIchir	18%	136	81%	31%

**Tableau 4 : Développement des embryons de type 411 au stade blastocyste et taux de blastocystes « Top Qualité » en fonction de l'origine du sperme et de la technique de FIV.**

La technique de fécondation (FIV classique vs ICSI) ne semble pas avoir d'impact significatif sur les taux de blastocystes et de blastocystes « Top Qualité » pour les embryons 411.

Les paramètres spermatiques ne semblent pas avoir d'impact significatif sur les taux de blastocystes. Cependant, les embryons 411 obtenus à partir d'un sperme provenant d'un don donneraient des blastocystes de meilleure qualité alors que les embryons 411 issus d'un prélèvement chirurgical évolueraient vers des blastocystes d'aspects morphologiques moins satisfaisants.

#### 4.2.4- Influence des milieux de culture prolongée

Les taux de blastocystes et de blastocystes « Top Qualité » ont été calculés chez les femmes âgées de moins de 37 ans, sur des embryons de type 411 mis en culture prolongée hors ICSI chir.

Au cours de la période d'étude 2006-2016, deux types de milieux provenant de différents fournisseurs (COOK, ORIGIO, MEDICULT et VITROLIFE) ont été utilisés (cf figure 25) :

- des milieux séquentiels :

\* COOK [2007-2013]: Blastocyst Medium®

\* MEDICULT [2007]: Blast Assist®

\* VITROLIFE [2006/2014-2016]: Vitrolife série G®

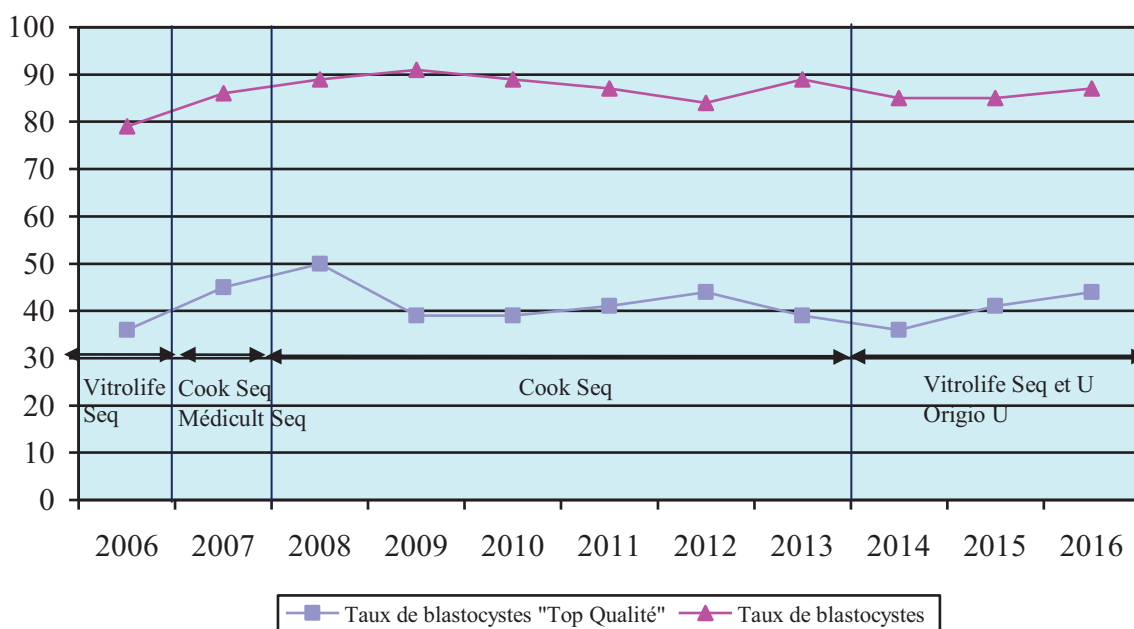
- des milieux uniques:

\* VITROLIFE [2015-2016]: GTL®

\* ORIGIO [2015-2016]: Sage®

Le taux de blastocystes varie entre 79 et 91% depuis 2006 (cf figure 26).

Le taux de blastocystes « Top Qualité » fluctue entre 36 et 50% depuis 2006.



**Figure 26 :** Evolution du taux de blastocyste et de blastocyste « Top Qualité » en fonction des milieux utilisés.  
Seq : séquentiel ; U : unique.

- **Les milieux séquentiels**

Les milieux séquentiels majoritairement utilisés au sein de notre centre entre 2006 et 2016 sont les milieux VITROLIFE et COOK.

Les taux les plus élevés de blastocystes (88%) sont issus d'une culture prolongée en milieux COOK ( $p<0,0001$ ).

Les taux les plus faibles de blastocystes (77%) sont issus d'une culture prolongée en milieux Blast Assist® (MEDICULT).

En revanche, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différents milieux en ce qui concerne le taux de blastocystes « Top qualité ».

- **Les milieux uniques**

Les deux principaux milieux uniques utilisés dans notre centre entre 2006 et 2016 sont les milieux Sage de ORIGIO et GTL de VITROLIFE.

Les taux de blastocystes ne sont pas significativement différents entre les milieux Sage et GTL (90% et 94%, respectivement ;  $p=0,27$ ) et ne présentent pas de taux de blastocystes « Top Qualité » significativement différents (44% et 46%, respectivement). Cependant, les effectifs restent encore faibles (Sage n=128 et GTL n=71) (cf **tableau 5**)

- **Comparaison milieux séquentiels et uniques**

Le taux de blastocystes est significativement plus élevé pour les milieux uniques, tout fournisseur confondu, par rapport aux milieux séquentiels (91% et 86%, respectivement ;  $p=0,04$ ) sans amélioration significative de la qualité des blastocystes obtenus (45% et 41%, respectivement ;  $p=0,5$ ) (cf **tableau 5**).

Fournisseurs	Période	Milieu	Type	Nombre d'embryons en CP*	Taux global de blastocystes	Taux de blastocystes « Top Qualité »
Vitrolife	2006	Série G3	Séquentiel	185	77% (abcd)	37%
	2014-2016	Série G5	Séquentiel	1525	84% (aefg)	39%
	2015-2016	GTL	Unique	98	94% (beh)	46%
Medicult	2007	Blast Assist	Séquentiel	106	77% (fhij)	32%
Cook	2007-2013	Blastocyst medium Cook	Séquentiel	3373	88% (cgi)	42%
Origio	2015-2016	Sage	Unique	175	90% (dj)	44%

**Tableau 5 : Milieux de culture prolongée utilisés au sein de notre centre entre 2006 et 2016.**

Les taux de blastocystes présentant les mêmes lettres sont significativement différents entre eux ( $p<0,05$ ).

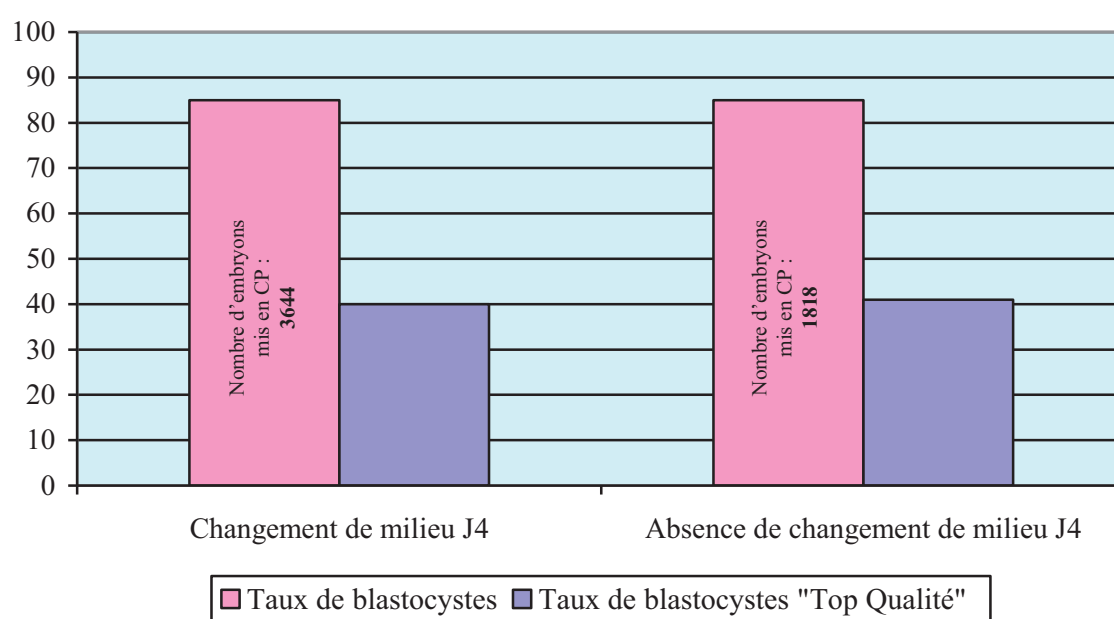
CP = culture prolongée.

\* inclut uniquement des embryons 411, chez des femmes âgées de moins de 37 ans, hors ICSI chir.

Les milieux COOK sont associés à un taux de blastocystes significativement plus élevé par rapport aux autres milieux séquentiels sans améliorer la qualité des blastocystes obtenus. Les milieux uniques ont un taux de blastocystes significativement plus élevé que les milieux séquentiels, sans amélioration de la qualité des blastocystes obtenus.

#### 4.2.5- Influence du renouvellement du milieu à J4 (milieux séquentiels)

Après une période d'étude se déroulant entre 2008 et 2014, il a été observé que le fait de renouveler le milieu à J4 n'a aucun impact ( $p=0,68$ ) sur le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste (85% versus 85%, respectivement) pour les embryons d'aspect 411 mis en culture prolongée ainsi que sur leur développement jusqu'à un blastocyste « Top Qualité » (40% versus 41%, respectivement ; cf **figure 27**).



**Figure 27 :** Taux de blastocystes et taux de blastocystes « Top Qualité » en fonction de la réalisation ou non d'un changement de milieu à J4 pour les embryons d'aspect 411.  
CP = culture prolongée.

En milieu séquentiel, le changement de milieu à J4 n'améliore pas les taux de blastocystes et de blastocystes « Top Qualité ». C'est pourquoi, depuis janvier 2015, pour les milieux séquentiels, la mise en culture prolongée s'effectue à J2 sans aucun autre changement jusqu'à J5-J6.

#### 4.2.6- Influence des conditions physiques de culture

Au sein de notre centre, sur la période 2006-2016, deux types d'incubateurs ont été utilisés dans trois conditions différentes :

- Incubateur 150L 3 gaz avec sortie des embryons pour observations
- Incubateur 150L 3 gaz sans sortie des embryons (Caméras Primovision)
- Mini incubateurs KMinc avec sortie des embryons pour observations

La chronologie est indiquée dans le **tableau 6**.

Afin de minimiser les biais, l'étude de ce paramètre a été menée à partir d'une population cible dont les critères étaient les suivants :

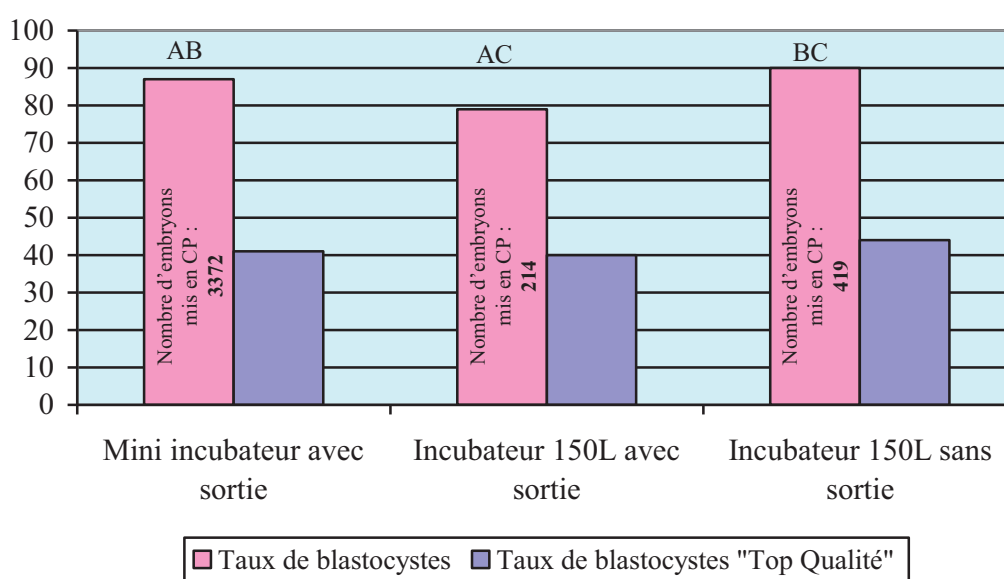
- femmes âgées de moins de 37 ans
- embryons de type 411 mis en culture prolongée
- exclusion des embryons obtenus par ICSI-chir
- exclusion des milieux MEDICULT

	Incubateurs	Nombre d'embryons 411 mis en culture prolongée
2006	- Incubateur 150L <b>avec sortie</b> des embryons	1616
2007-2011	- Mini incubateurs <b>avec sortie</b> des embryons	11848
2012	- Mini incubateurs <b>avec sortie</b> des embryons	2229
	- Incubateur 150L <b>avec sortie</b> des embryons	198
2013	- Mini incubateurs <b>avec sortie</b> des embryons	2177
	- Incubateur 150L <b>avec sortie</b> des embryons	7
	- Incubateur 150L <b>sans sortie</b> des embryons	291
2014-2016	- Mini incubateurs <b>avec sortie</b> des embryons	6627
	- Incubateur 150L <b>sans sortie</b> des embryons	521

**Tableau 6 :** Conditions d'utilisation des incubateurs au sein de notre centre entre 2006 et 2016.

Une absence de sortie des embryons pour observation à J1/J2 est associée à un taux de blastocystes significativement augmenté (90% vs 87%, respectivement ;  $p=0,02$ ) sans améliorer la qualité morphologique des blastocystes obtenus (cf **figure 28**).

En cas de sortie des embryons à J1 et J2 pour observation, le taux de blastocystes est significativement plus élevé lors de l'utilisation de mini incubateurs que lors de l'utilisation d'incubateurs de 150L (87% vs 79%, respectivement ;  $p<0,0001$ ) sans améliorer la qualité des blastocystes obtenus.



**Figure 28 :** Taux de blastocystes et de blastocystes « Top Qualité » en fonction du type d'incubateur. Les colonnes possédant la même lettre ont des résultats significativement différents ( $p<0,05$ ). CP = culture prolongée.

La culture embryonnaire sans sortie des embryons à J1 et J2 pour observation morphologique améliore significativement le taux de blastocyste sans améliorer l'aspect morphologique des blastocystes obtenus.

En cas de sorties des embryons pour des observations à J1 et J2, le taux de blastocystes est significativement plus élevé lors de l'utilisation de mini incubateurs par rapport à des incubateurs de 150L.

## 4.3- Stratégie de transfert au stade blastocyste

### 4.3.1- Aspect morphologique du blastocyste et implantation

Afin d'évaluer le devenir clinique des blastocystes transférés en fonction de leur morphologie, le taux d'implantation a été déterminé dans les conditions suivantes :

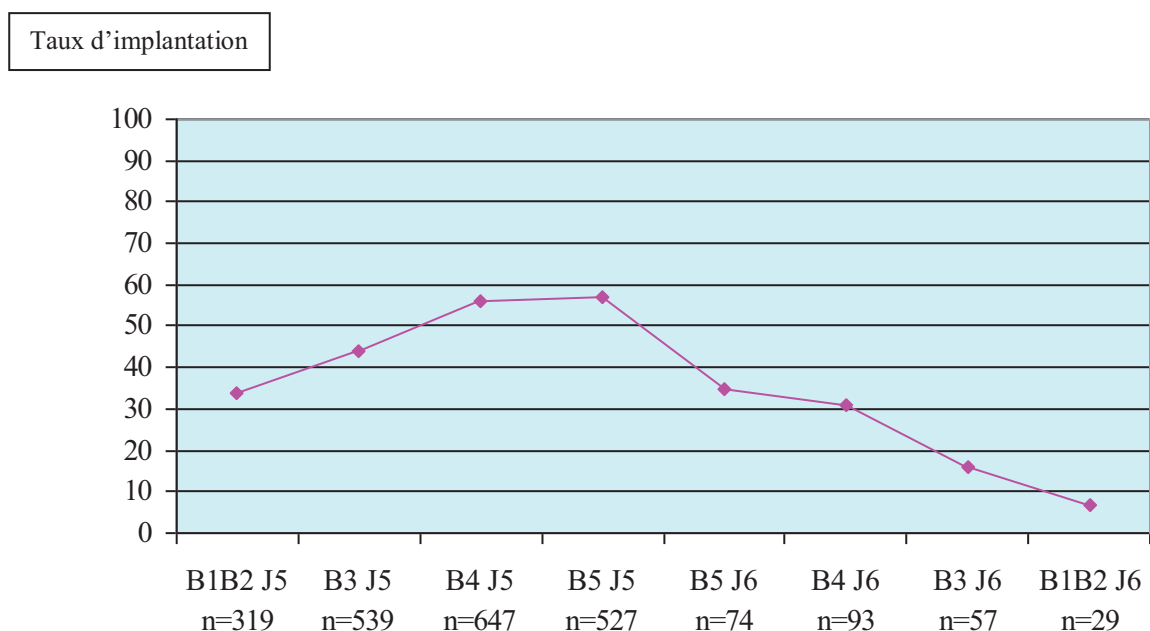
- transfert d'un blastocyste unique
- femmes âgées de moins de 37 ans
- tentative de FIV de rang 1 ou 2

#### a) Jour et stade d'expansion

A J5, le taux d'implantation augmente du stade B1 aux stades B4/B5 (34% à 57%,  $p<0,0001$ ) avec un résultat similaire entre les stades B4 et B5 (56% et 57%, respectivement ; cf **figure 29**).

A J6, le taux d'implantation diminue du stade B5 au stade B1 (35% à 7%) avec un taux proche entre les stades B4 et B5 (31% et 35%, respectivement).

Les taux d'implantation sont similaires entre un blastocyste présentant un stade B1/B2 à J5 (34%) et un stade B4/B5 à J6 (31% et 35% respectivement).



**Figure 29 :** Taux d'implantation en fonction du jour et du stade d'expansion au moment du transfert (transfert unique pour des femmes âgées de moins de 37 ans).

Le jour du transfert et le stade d'expansion du blastocyste au moment du transfert influencent le devenir clinique du blastocyste.

Les résultats suivants ont été obtenus dans les conditions suivantes :

- Femmes âgées de moins de 37 ans
- Ponctions de rang 1 et 2
- Blastocystes présentant un stade d'expansion B3 et B4-B5
- Transfert à J5 seulement

Le taux de grossesse clinique par ponction diminue significativement avec l'aspect morphologique du trophoctoderme, d'autant plus rapidement si le blastocyste est peu expansé (cf **tableau 7**). En effet, les blastocystes présentant un trophoctoderme classé A ont 59% de chance de s'implanter et de donner une grossesse clinique quel que soit le stade d'expansion vs 32% pour les B3 présentant un trophoctoderme classé C et 44% pour les B4-B5 présentant un trophoctoderme classé C.

Le taux de grossesse clinique par ponction diminue également avec l'aspect morphologique de la MCI, d'autant plus rapidement si le blastocyste est peu expansé mais de façon non significative. Les blastocystes présentant une MCI classée A ont 48% (B3) et 60% (B4-B5) de donner une grossesse clinique contre 33% (B3) et 48% (B4-B5) pour les blastocystes dont la MCI est classée C.

		Taux de grossesse clinique par ponction	
		B3	B4-B5
T	A	59% (a) (161)	59% (c) (129)
	B	47% (b) (98)	58% (d) (291)
	C	32% (ab) (37)	44% (cd) (66)
MCI	A	48% (24)	60% (187)
	B	43% (117)	55% (269)
	C	33% (10)	48% (30)

a : p=0,009 ; b : p=0,009 ; c : p=0,004 ; d : p=0,002

**Tableau 7 : Taux de grossesse clinique par ponction en fonction de l'aspect du trophoctoderme, de la masse cellulaire interne et du stade d'expansion à J5.**

En associant les 3 stades d'expansion, les blastocystes possédant un trophectoderme A présentent un taux de grossesse clinique par ponction d'environ 60% sans influence de l'aspect de la MCI (cf **tableau 8**). En revanche, les blastocystes présentant un trophectoderme de moins bonne qualité ont un taux de grossesse clinique par ponction plus faible, diminuant également avec l'aspect de la MCI. Un blastocyste qui présente une organisation cellulaire Tc Ic a 24% de probabilité d'aboutir à une grossesse.

Le taux global de grossesse clinique par ponction diminue avec l'aspect du trophectoderme et de la MCI, passant de 60% à 40% environ.

B3-B4-B5					
MCI					
T		A	B	C	Pourcentage global (T)
	A	58% (72)	60% (b) (63)	71% (d) (10)	59%
	B	62% (af) (130)	53% (cf) (237)	50% (e) (22)	55%
	C	38% (a) (9)	42% (bcg) (86)	24% (deg) (8)	40%
	Pourcentage global (IMC)	59%	51%	43%	

a : p=0,02 ; b : p=0,002 ; c : p=0,01 ; d : p=0,002 ; e : p=0,01 ; f : p=0,03 ; g : p=0,04

**Tableau 8 :** Taux de grossesse clinique par ponction en fonction de l'aspect du trophectoderme et de la masse cellulaire interne combinés à J5.

L'organisation du trophectoderme à J5 influence significativement le taux de grossesse clinique par ponction. Cependant, la morphologie combinée du blastocyste à J5 comme aide à la décision biologique a ses limites car les blastocystes de moins bonne qualité (Tc Ic) ont une probabilité peut-être moindre de s'implanter mais non nulle.

#### 4.3.2- Application clinique

L'étude du devenir clinique des blastocystes transférés en fonction de différents paramètres (rang de la ponction, âge de la femme, nombre de blastocystes transférés) peut permettre d'évaluer la stratégie de transfert et ainsi optimiser les taux de grossesse clinique tout en minimisant le taux de grossesse multiple.

Actuellement, la stratégie de transfert instaurée dans notre centre est la suivante :

- **Transfert d'un blastocyste (T1B)** : femmes de moins de 37 ans + rangs de ponction 1 et 2.

- **Transfert de deux blastocystes (T2B)** : femmes de 37 ans et plus ou rangs de ponction 3 et 4.

a) Devenir clinique en fonction du rang de la ponction et de l'âge de la patiente

En ce qui concerne les femmes de moins de 37 ans (cf tableau 9) :

- Le taux de transfert est de l'ordre de 92-93% lors des ponctions de rang 1-2 et de 82-85% pour un rang 3-4.
- Le taux de grossesse clinique avoisine les 45% lors du transfert d'un seul blastocyste pour les ponctions de rangs 1 et 2 avec un taux de grossesse multiple (monozygotiques) de l'ordre de 4%.
- Le transfert de 2 blastocystes lors des ponctions de rangs 3 et 4 permet d'obtenir un pourcentage de grossesse clinique similaire à la situation précédente mais est associé à un taux de grossesse multiple important (environ 35%).
- Le transfert d'un blastocyste unique pour les ponctions de rang 3 et 4 abaisse le taux de grossesse clinique à 30%.

Femmes < 37 ans						
	Nombre de ponctions	Taux de transfert	Stratégie de transferts	Taux de grossesse clinique/ponction	Taux de grossesse multiple/grossesse	Taux d'implantation
Rang 1	1747	93% (1618)	<b>T1B</b> 100% (1618)	42% (737)	3% (22)	47%
Rang 2	811	92% (743)	<b>T1B</b> 100% (743)	46% (340)	5% (18 dont 1 triple)	49%
Rang 3	512	85% (434)	<b>T1B</b> 38% (165)	30% (50)	4% (2)	31%
			<b>T2B</b> 62% (269)	45% (120)	35% (42)	62%
Rang 4	359	82% (294)	<b>T1B</b> 30% (87)	32% (28)	11% (3)	35%
			<b>T2B</b> 70% (207)	46% (95)	33% (31)	61%

**Tableau 9 :** Taux de transfert, de grossesses cliniques par ponction, de grossesses multiples et d'implantation, en fonction du rang de la ponction chez les femmes âgées de moins de 37 ans.

En ce qui concerne les femmes de 37 ans et plus (cf tableau 10) :

- Le taux de transfert avoisine les 90% pour les ponctions de rang 1-2 et de presque 85% pour les rangs 3-4.
- Le taux de grossesse clinique est similaire au taux de grossesse clinique des femmes de moins de 37 ans lors de la ponction 1 et 2 (environ 45%) en cas de transfert de 2 blastocystes, quel que soit le rang de la ponction (rangs 1 à 4).
- Cependant, le transfert de 2 blastocyste augmente de façon importante le taux de grossesse multiple (environ 20%), bien que plus faible par rapport aux femmes âgées de moins de 37 ans.
- Le transfert d'un blastocyste unique pour les ponctions de rang 3 et 4 abaisse le taux de grossesse clinique à 35% pour les ponctions de rang 1 et 2 et à 25% pour les ponctions de rang 3 et 4.

Femmes ≥ 37 ans						
	Nombre de ponctions	Taux de transfert	Stratégie de transfert	Taux de grossesse clinique/ponction	Taux de grossesse multiple/grossesse	Taux d'implantation
Rang 1	402	92% (371)	<b>T1B</b> 88% (327)	32% (104)	3% (3)	33%
			<b>T2B</b> 12% (44)	45% (20)	10% (2)	50%
Rang 2	250	88% (221)	<b>T1B</b> 75% (166)	41% (68)	3% (2)	42%
			<b>T2B</b> 25% (55)	40% (22)	18% (4)	47%
Rang 3	227	83% (189)	<b>T1B</b> 42% (79)	25% (20)	0% (0)	25%
			<b>T2B</b> 58% (110)	37% (41)	22% (9)	45%
Rang 4	186	84% (157)	<b>T1B</b> 33% (52)	25% (13)	8% (1)	27%
			<b>T2B</b> 67% (105)	42% (44)	18% (8)	50%

**Tableau 10 :** Taux de transfert, de grossesses cliniques par ponction, de grossesses multiples et d'implantation, en fonction de l'âge et du rang de la ponction chez les femmes âgées de 37 ans et plus.

Le taux de grossesse clinique en cas du transfert d'un seul blastocyste lors des ponctions 1 et 2 est similaire au taux de grossesse clinique en cas de transfert de 2 blastocystes lors des ponctions 3 et 4 chez les femmes âgées de moins de 37 ans. Le taux de grossesse clinique lors du transfert de 2 blastocystes chez les femmes âgées de 37 ans et plus est similaire au taux de grossesses cliniques chez les femmes âgées de moins de 37 ans lors du transfert d'un blastocyste aux cours des ponctions 1 et 2.

Chez les femmes âgées de 37 ans et plus, il faut donc transférer deux blastocystes pour obtenir un taux de grossesse clinique similaire à celui obtenu chez des femmes âgées de moins de 37 ans.

Le transfert de 2 blastocystes augmente les risques de grossesse multiples.

b) Devenir clinique en fonction d'une congélation associée à la ponction chez les femmes âgées de moins de 37 ans

Le taux d'implantation est significativement plus élevé lorsqu'une congélation est possible au cours du cycle associé au transfert, quel que soit le nombre de blastocystes transférés et le rang de la ponction (cf **tableau 11**).

Lors des cycles avec congélation, le taux d'implantation est similaire entre le transfert d'un blastocyste lors des ponctions 1-2 et des ponctions 3-4 (52%). Le transfert de 2 blastocystes augmente le taux d'implantation lors des ponctions 3 ou 4 (76%).

Lors des cycles sans congélation, le taux d'implantation est plus important lors du transfert de 2 blastocystes (52%) versus un blastocyste (29%). Il est aussi plus important en cas de transfert d'un seul blastocyste à un rang 1-2 par rapport à un rang 3-4.

Le taux de blastocystes « Top Qualité » est significativement plus élevé lors des cycles avec congélation en cas de ponctions 1 et 2 (32% versus 17%). En revanche, cette différence significative n'est pas retrouvée en cas de ponction 3-4 mais les effectifs restent encore faibles.

Rang de la ponction	Stratégie de transfert	Congélation	Taux de blastocystes « Top Qualité »	Significativité p	Taux d'implantation	Significativité p
Rangs 1 et 2	T1B	avec congélation (1498)	32% (373)	P < 0,0001	52%	P < 0,0001
		sans congélation (795)	17% (70)		37%	
Rangs 3 et 4	T1B	avec congélation (42)	30% (9)	P = 0,1	52%	P = 0,007
		sans congélation (209)	16% (21)		29%	
	T2B	avec congélation (179)	25% (35)	P = 0,7	76%	P = 0,003
		sans congélation (297)	23% (45)		52%	

**Tableau 11 :** Taux d'implantation et de blastocyste « Top Qualité » en fonction du taux de congélation par cycle.

Le taux d'implantation après transfert de blastocystes frais est plus important en cas de congélation au cours du même cycle quel que soit le rang de la ponction chez les femmes de moins de 37 ans.

En l'absence de congélation au cours du même cycle, le taux d'implantation est amélioré lors du transfert de 2 blastocystes versus 1 en cas de ponctions 3 et 4.

c) Devenir clinique en fonction du nombre d'embryons 411 en culture prolongée

Le taux de transfert au stade blastocyste est significativement plus élevé (au-delà de 90%) lorsque les couples possèdent au moins un embryon de type 411 à J2 mis en culture prolongée, quels que soit l'âge de la femme et le rang de la ponction (cf tableau 12). En l'absence de 411, le taux de transfert varie de 71% à 82%.

Le taux de grossesses cliniques par ponction est significativement plus élevé lorsque les couples possèdent au moins un embryon de type 411 à J2 mis en culture prolongée pour les femmes âgées de moins de 37 ans, quel que soit le rang de la ponction. En revanche, pour les femmes de 37 ans et plus, le taux de grossesses cliniques par ponction est significativement plus important quand au moins 2 embryons d'aspect 411 à J2 sont obtenus.

Le taux d'implantation est plus faible chez les femmes âgées de 37 ans et plus (entre 25 et 56%) que chez les femmes âgées de moins de 37 ans (entre 41% et 66%) quel que soit le nombre d'embryons 411 mis en culture prolongée. Le taux d'implantation augmente avec le nombre d'embryons 411 mis en culture prolongée.

Période d'étude 2006-2016					
	Rang de la ponction	Aspect des embryons mis en culture prolongée	Taux de transfert au stade blastocyste	Taux de grossesse par ponction	Taux d'implantation
Femmes < 37 ans	P1-P2	aucun 411	82% (ab)	35% (cd)	42%
		un 411	96% (a)	41% (ce)	45%
		≥ deux 411	97% (b)	51% (de)	55%
	P3-P4	aucun 411	71% (fg)	24% (hi)	41%
		un 411	93% (f)	41% (h)	57%
		≥ deux 411	97% (g)	46% (i)	66%
Femmes ≥ 37 ans	P1-P2	aucun 411	79% (jk)	28% (l)	35%
		un 411	95% (j)	32%	36%
		≥ deux 411	97% (k)	39% (l)	43%
	P3-P4	aucun 411	75% (mn)	22% (o)	25%
		un 411	92% (m)	31%	39%
		≥ deux 411	94% (n)	44% (o)	56%

a : p < 0,0001 ; b : p < 0,0001 ; c : p = 0,006 ; d : p < 0,0001 ; e : p = 0,0003 ; f : p < 0,0001 ; g : p < 0,0001 ; h : p < 0,0001 ; i : p < 0,0001 ; j : p < 0,0001 ; k : p < 0,0001 ; l : p = 0,009 ; m : p < 0,0001 ; n : p = 0,0001 ; o : p = 0,0003

**Tableau 12 :** Taux de transfert au stade blastocyste, de grossesses cliniques par ponction et d'implantation en fonction de du nombre d'embryons d'aspect 411 à J2 mis en culture prolongée par couple.

La présence d'au moins un embryon 411 à J2 donne plus de 95% de chance au couple d'avoir un transfert contre 75% si aucun embryon 411 n'est obtenu à J2.

Le taux de grossesse clinique par ponction diminue avec le nombre d'embryons 411 mis en culture prolongée.

Le taux d'implantation augmente avec le nombre d'embryons 411 obtenu à J2 mais reste plus faible chez les femmes âgées de 37 ans et plus par rapport aux femmes âgées de moins de 37 ans.

La présence d'au moins un embryon 411 à J2 donne plus de 95% de chance au couple d'avoir un transfert au stade blastocyste quel que soit l'âge de la femme et le rang de la ponction.

Cependant, en l'absence d'embryon 411 à J2 lors des ponctions 1 et 2, faut-il privilégier le transfert au stade précoce afin d'assurer un transfert ou faut-il privilégier un transfert au stade blastocyste malgré un taux de transfert plus faible (entre 71% et 82%)?

Nous avons comparé, dans la suite de notre étude, le devenir clinique après transfert de blastocystes versus transfert d'embryons en fonction du nombre d'embryons 411 obtenus à J2.

d) Comparaison J2 vs J5/J6 en fonction du nombre d'embryons 411 disponibles à J2

Cette observation a été faite sur la période 2010-2016, chez les femmes âgées de moins de 37 ans et 37 ans et plus au cours des ponctions 1-2, hors don d'ovocyte.

**Chez les femmes de moins de 37 ans :**

- Le taux de transfert au stade blastocyste est supérieur à 95% lorsqu'au moins un embryon 411 est obtenu à J2 (cf **tableau 13**).
- Lorsqu'aucun embryon 411 n'est obtenu à J2, le taux de grossesse clinique est plus important lors du transfert d'un seul blastocyste par rapport au transfert d'un seul embryon. Dans ce contexte, le transfert de 2 embryons améliore le taux de grossesse clinique qui devient similaire à un transfert d'un seul blastocyste (34%).
- Lorsqu'au moins 1 embryon 411 est obtenu à J2, le taux de grossesse clinique avoisine les 50% lors du transfert d'un seul blastocyste contre 44% lors du transfert d'un seul embryon. Dans ce contexte, le transfert de 2 embryons améliore le taux de grossesse clinique qui devient similaire au transfert d'un seul blastocyste.

Période d'étude 2010-2016							
Femmes < 37 ans  P1-P2	Transfert embryonnaire J2						
	Nombre d'embryons transférés	Nombre d'embryons 411	Nombre de cycles	Nombre de transferts	Taux de transfert	Taux de grossesse/ponctions	Taux de grossesse/transfert
	T1E	Aucun	275	275	100%	25% (a) (n=70)	25% (n=70)
		≥1	151	151	100%	44% (n=66)	44% (n=66)
	T2E	Aucun	163	163	100%	34% (n=55)	34% (n=55)
		≥1	85	85	100%	53% (n=45)	53% (n=45)
	Transfert au stade blastocyste J5/J6						
	T1B	Aucun	710	590	83%	34% (a) (n=243)	41% (n=243)
		≥1	1080	1061	98%	49% (n=534)	50% (n=534)

a : p < 0,0001

**Tableau 13 :** Taux de transfert au stade blastocyste et de grossesses cliniques par ponction et par transfert en fonction de du nombre d'embryons d'aspect 411 à J2 mis en culture prolongée chez les femmes âgées de moins de 37 ans.

Chez les femmes âgées de moins de 37 ans, le taux de grossesses cliniques augmente avec le nombre d'embryons 411 mis en culture prolongée. Le transfert de 2 embryons à J2 présente un taux de grossesse clinique similaire à un transfert d'un seul blastocyste quel que soit le nombre d'embryon 411 obtenus à J2.

**Chez les femmes de 37 ans et plus :**

- Le taux de transfert au stade blastocyste est supérieur à 95%, chez les femmes âgées de 37 ans et plus lorsqu'au moins un embryon 411 est obtenu à J2 (cf **tableau 14**).
- Lorsqu'aucun embryon 411 n'est obtenu à J2, le taux de grossesse clinique se situe entre 20% et 30% quel que soit la stratégie de transfert.
- Lorsqu'au moins un embryon 411 est obtenu à J2, le taux de grossesse clinique est supérieur à 40% lors du transfert d'un blastocyste unique contre 27% lors du transfert d'un embryon unique. Le transfert de 2 embryons améliore le taux de grossesse clinique qui devient similaire au transfert d'un seul blastocyste (39%).

Période d'étude 2010-2016							
Femmes 37 ans et plus  P1-P2	Transfert embryonnaire J2						
	Nombre d'embryons transférés	Nombre d'embryons 411	Nombre de cycle	Nombre de transferts	Taux de transfert	Taux de grossesse/ponction	Taux de grossesse/transfert
	T1E	Aucun	105	105	100%	20% (n=12)	20% (n=12)
		≥1	30	30	100%	27% (n=8)	27% (n=8)
	T2E	Aucun	73	73	100%	30% (n=22)	30% (n=22)
		≥1	56	56	100%	39% (n=22)	39% (n=22)
	Transfert au stade blastocyste J5/J6						
	T1B	Aucun	141	119	84%	26% (n=36)	30% (n=36)
		≥1	136	134	99%	41% (n=56)	42% (n=56)
	T2B	Aucun	40	30	75%	25% (n=10)	33% (n=10)
		≥1	41	40	98%	46% (n=19)	48% (n=19)

**Tableau 14 :** Taux de transfert au stade blastocyste et de grossesses cliniques par ponction et par transfert en fonction du nombre d'embryons d'aspect 411 à J2 mis en culture prolongée chez les femmes âgées de 37 ans et plus.

Chez les femmes âgées de 37 ans et plus, le taux de grossesses cliniques augmente avec le nombre d'embryons 411 mis en culture prolongée. Lorsqu'au moins un embryon 411 est obtenu à J2, le transfert de 2 embryons à J2 présente un taux de grossesse clinique similaire au transfert d'un seul blastocyste. En l'absence d'embryon 411 à J2, le taux de grossesse clinique avoisine les 25% quel que soit la stratégie de transfert adoptée.

## 5- DISCUSSION

La culture embryonnaire prolongée est actuellement une activité de routine au sein du centre de Médecine et Biologie de la Reproduction au CHRU de Tours, permettant d'améliorer la sélection embryonnaire en vue d'un transfert ou d'une congélation.

Mon travail a permis de faire un état des lieux de cette activité sur une période de 11 ans (2006 à 2016) et ainsi inclure plus de 25000 embryons.

Une première partie a consisté en l'analyse de différents facteurs pouvant influencer l'obtention de blastocyste. Dans une seconde partie, je me suis intéressée au devenir biologique et clinique des blastocystes transférés en fonction de la stratégie de transfert adoptée.

L'intérêt de mon travail sur la culture prolongée, activité mise en place depuis maintenant plusieurs années au sein de notre centre est de permettre d'améliorer le potentiel de développement des embryons jusqu'au stade blastocyste en identifiant les facteurs pouvant influencer ce paramètre et ainsi les modifier afin d'obtenir des taux de blastocystes et de blastocystes de « Top Qualité » plus importants. De même, l'étude du devenir biologique et clinique des blastocystes transférés a permis d'évaluer notre stratégie de transfert actuelle (transfert d'un blastocyste versus transfert de 2 blastocystes) afin d'améliorer les taux d'implantation et de grossesse clinique sans augmenter le taux de grossesse multiple.

L'amélioration de cette activité est devenue essentielle afin d'optimiser les résultats et permettre ainsi à chaque couple d'aboutir à leur projet parental dans un délai minimal.

La culture prolongée a débuté au sein de notre centre dans les années 90 et concernait principalement les cohortes embryonnaires partielles. Depuis 1998, la mise en place des cultures prolongées sur cohortes totales est progressivement croissante, avoisinant les 65% depuis 2008.

L'augmentation de cette activité a été possible grâce aux progrès effectués au sein de cette spécialité de PMA qui a permis d'observer une augmentation du taux de blastocystes, depuis 2006, passant de 48% aux environs de 60% en 2016. La culture prolongée est donc devenue une pratique de routine, proposée de façon régulière aux couples pris en charge dans notre centre.

Cependant, de nombreux paramètres peuvent influencer le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste. Nous avons essayé de nous intéresser aux principaux paramètres potentiellement modifiables afin de permettre d'améliorer cette pratique.

## 5.1- Quels sont les paramètres influençant le développement au stade blastocyste ?

### 5.1.1- Les caractéristiques morphologiques des embryons

Depuis de nombreuses années, la description morphologique de l'embryon à J2 ou J3 est la technique non invasive utilisée en routine afin de prédire les capacités de développement embryonnaire et ainsi décider de son devenir : transfert, congélation, élimination.

Nous avons voulu évaluer si l'aspect morphologique de l'embryon à J2 avait un impact sur sa capacité de développement jusqu'au stade blastocyste.


L'évaluation morphologique des embryons à J2 est un examen permettant d'établir un score qui prend en compte le nombre de blastomères, leur régularité et la proportion de fragments.

Le nombre de blastomères influence la capacité de développement *in vitro* de l'embryon jusqu'au stade blastocyste. En effet, notre étude a démontré que le taux de blastocystes ainsi que le taux de blastocystes « Top Qualité » sont plus élevés pour les embryons de référence (4 blastomères) par rapport aux embryons « rapides » (plus de 5 blastomères) qui ont eux-mêmes une probabilité plus importante d'atteindre le stade blastocyste que les embryons « lents » (2 et 3 blastomères). Ces résultats viennent confirmer une étude réalisée dans notre centre en 2007 montrant que les embryons possédant 4 cellules à J2 ont plus de chance de se développer jusqu'au stade blastocyste ( $p < 0,0001$ ; Guérif et al. 2007). De même, Sjoblom avait mis en évidence dans son étude regroupant 420 embryons mis en culture prolongée que les embryons possédant 4 blastomères avaient un taux de blastocystes plus élevé que les embryons à 5 blastomères et plus que eux-mêmes avaient un taux de blastocystes plus élevé que les embryons possédant 2 ou 3 blastomères à J2 (Sjoblom et al. 2006).

 **Les embryons présentant 4 blastomères à J2 ont la probabilité la plus élevée de se développer jusqu'au stade blastocyste.**

La régularité des cellules embryonnaires à J2 est un paramètre difficile à interpréter car il faut prendre en compte le nombre de blastomère afin de définir si l'embryon est régulier ou non. En effet, un embryon en cours de division, dont la chronologie est correcte va présenter des blastomères de même taille à 2 cellules, 4 cellules, 6 cellules et 8 cellules mais des blastomères de taille différente à 3 cellules, 5 cellules et 7 cellules. Dans notre étude regroupant 26857 embryons, nous avons considéré qu'un embryon était régulier lorsque la taille des cellules était concordante avec le nombre de blastomères au moment de l'observation.

Nous avons démontré que les embryons présentant un aspect régulier à J2 ont plus de chance de se développer jusqu'au stade blastocyste (62% versus 54% ;  $p<0,0001$ ) ainsi que de présenter un aspect « Top Qualité » au stade blastocyste (26% versus 22% ;  $p<0,0001$ ). Ces résultats sont concordants avec l'étude réalisée au sein de notre centre en 2010 (Guérif et al. 2010). Dans son étude de 2003, Hardarson a suggéré qu'un taux d'anomalies chromosomiques plus important était observé pour les embryons dont les blastomères présentaient une taille irrégulière (Hardarson et al. 2003), expliquant le faible taux de blastocystes dans ce contexte.

 **La régularité des cellules à J2 influence favorablement le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste.**

La proportion de fragments cytoplasmiques des embryons à J2 a un impact important sur le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste ainsi que sur l'aspect « Top Qualité » du blastocyste obtenu. En effet, dans notre étude portant sur 26857 embryons mis en culture prolongée, nous avons montré que les embryons présentant moins de 10% de fragments cytoplasmiques à J2 ont plus de chance de se développer jusqu'au stade blastocyste (68% versus 28% ;  $p<0,0001$ ) et de présenter un aspect « Top Qualité » (29% versus 7% ;  $p<0,0001$ ). Ces résultats viennent confirmer ceux de l'étude réalisée dans notre centre en 2007 sur 4042 embryons mis en culture prolongée qui a montré qu'un taux de fragmentation inférieur à 20% favorisait le développement jusqu'au stade blastocyste (Guérif et al. 2007). D'autres études ont également mis en avant que le taux de blastocystes était significativement diminué lorsque le taux de fragmentation était important à J2 (Alikani et al. 2000 ; Hardy et al. 2003). Certains auteurs expliquent ce phénomène par le fait que les fragments cytoplasmiques pourraient empêcher l'interaction entre les blastomères et ainsi altérer la compaction et la formation de blastocyste (Van Blerkom et al. 2001). D'autres soulèvent l'hypothèse que des substances produites lors de l'apparition des fragments cytoplasmiques seraient néfastes pour l'environnement de l'embryon (Alikini et al. 1999).

En 2006, l'équipe de Eftekhari-Yazdi a suggéré qu'un retrait microchirurgical des fragments cytoplasmiques améliorerait de façon significatif le taux de blastocystes des embryons présentant un taux de fragmentation élevé à J2 (52% versus 45% ;  $p < 0,05$ ) (Eftekhari-Yazdi et al. 2006).

➡ Les embryons présentant moins de 10% de fragments cytoplasmiques ont des taux de blastocystes et de blastocystes « Top Qualité » significativement plus élevés que les embryons présentant entre 10 et 50% de fragments cytoplasmiques qui ont, eux même des taux plus élevés que les embryons fragmentés à plus de 50% à J2.

Le code embryonnaire établi lors de l'observation des embryons à J2 nous permet d'appréhender le bon développement de l'embryon jusqu'au stade blastocyste lorsqu'il a été décidé d'une culture prolongée. En effet, nous avons montré que les taux de blastocystes et de blastocystes « Top Qualité » sont significativement plus élevés lorsque l'embryon présente un code de haute qualité soit 411, c'est-à-dire 4 cellules régulières avec moins de 10% de fragments cytoplasmiques (85% et 40% respectivement). Ce code est donc une aide afin de décider du devenir embryonnaire à J2 (transfert, culture prolongée ou élimination).

Ces résultats confirment les résultats de certaines études s'intéressant à la mise en place d'une codification associant différents paramètres et permettant d'être une aide pour la décision du devenir embryonnaire à J2 (Holte et al. 2007 ; Rhenman et al. 2014).

Cette codification est maintenant utilisée dans de nombreux centres d'AMP et est devenu une référence pour l'identification de l'embryon à J2.


➡ Les embryons « Top qualité » à J2 mis en culture prolongée ont plus de chance de se développer jusqu'au stade blastocyste et de présenter un aspect blastocyste « Top Qualité ».

### 5.1.2- L'âge de la femme

Notre étude a mis en évidence que les femmes de moins de 37 ans ont approximativement des taux de blastocystes similaires entre elles mais significativement plus élevés que les femmes de 37 ans et plus dont le taux de blastocystes diminue régulièrement. En revanche, l'âge des femmes n'a pas d'impact sur l'aspect morphologique des blastocystes obtenus.

Une étude menée sur 293 patients a montré que les femmes de moins de 40 ans avaient significativement plus de chance d'obtenir un blastocyste que les femmes de 40 ans et plus (Pantos et al. 1999). De même, une étude réalisée sur 529 patientes présentant au moins 1 zygote à J1, a montré qu'une diminution de 5 ans de l'âge des femmes permettait d'améliorer significativement le taux de blastocystes (Thomas et al. 2009).

Cette observation peut être expliquée par un degré d'expansion du blastocyste moins important chez les femmes présentant un âge maternel plus avancé (Braga et al. 2012).

 **Les embryons précoces des femmes de moins de 37 ans ont significativement plus de chance de se développer jusqu'au stade blastocyste sans que la qualité ne soit améliorée.**

### 5.1.3- La technique de fécondation

L'impact de la technique de fécondation sur le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste a largement été étudié dans la littérature. Cependant, les résultats obtenus restent très controversés. En effet, ce paramètre est difficilement interprétable car de nombreux facteurs interviennent dans le choix d'une technique de fécondation par rapport à une autre.

En 2000, Dumoulin a mis en évidence un effet délétère de l'ICSI sur le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste. Cependant, son étude a porté uniquement sur des cohortes embryonnaires partielles et donc sur des embryons surnuméraires de moins bonne qualité (Dumoulin et al. 2000).

La première étude s'intéressant à des cohortes totales d'embryons a été menée par l'équipe de Miller en 2001. Elle avait rapporté un taux de blastocystes plus faible lors des cycles d'ICSI (30%) par comparaison aux cycles de FIV classiques (52%) mais les spermatozoïdes utilisés en ICSI avaient des paramètres beaucoup plus altérés que ceux utilisés en FIV classique (Miller et al. 2001).

En contrepartie, d'autres études portant également sur des cohortes totales n'ont pas mis en évidence de différence significative entre ces 2 techniques de fécondation (Van Landuyt et al. 2005).

Dans mon travail de thèse, nous avons analysé seulement les embryons issus de cohortes totales et uniquement d'aspect 411 à J2. Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre la capacité de développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste des embryons 411 issus de FIV classique et ceux issus d'ICSI en ce qui concerne le sperme éjaculé, observation confirmée lors de la comparaison FIV classique avec sperme de donneurs versus ICSI avec sperme de donneurs.

#### 5.1.4- L'origine du sperme

En 2001, l'équipe de Balaban a mis en évidence que les spermatozoïdes issus de sperme éjaculé altéré ou chirurgical (testiculaire ou épидидymaire) sont plus à risque d'être porteurs d'anomalies chromosomiques et ainsi impacter le développement embryonnaire (Balaban et al. 2001b). Notre travail a permis de confronter différentes origines spermatiques associées aux deux techniques de fécondation (FIV classique et ICSI) afin d'évaluer s'il existe une association entre des paramètres spermatiques altérés et le taux de blastocystes. Même si la significativité n'a pas été retrouvée, il est intéressant de noter une décroissance du taux de blastocystes selon l'origine du sperme : sperme de donneur en FIV classique (91%), sperme éjaculé en FIV classique (88%), sperme éjaculé en ICSI (86%), sperme d'origine chirurgicale en ICSI (81%). Ces résultats ont été confirmés dans la littérature. En effet, une altération des paramètres spermatiques n'impacterait pas forcément la fécondation et le développement embryonnaire précoce mais serait associée à un taux de blastocystes plus faible (Janny et Ménezo, 1994). Cette observation serait expliquée par le fait que la production des transcrits paternels s'initierait après l'activation génomique embryonnaire (Asch et al. 1995).

Cependant, les paramètres spermatiques ne doivent pas être un critère de décision pour la mise en culture prolongée des embryons (Braga et al. 2013).

#### 5.1.5- Les milieux de culture

Actuellement, il existe 2 types de milieux permettant le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste : les milieux séquentiels et les milieux uniques.

Les milieux séquentiels sont utilisés depuis de nombreuses années dans les centres d'Aide Médicale à la procréation. Ils consistent en un changement de milieu à J2 permettant l'adaptation de l'environnement *in vitro* aux changements métaboliques de l'embryon en développement avant puis après le stade de compaction embryonnaire.

A l'opposé, les milieux uniques sont capables de supporter le développement embryonnaire de la fécondation jusqu'au stade blastocyste et donc éviter les modifications environnementales (pH et température) que subit l'embryon en cas de changement de milieu.

Les milieux uniques contiennent donc les nutriments nécessaires à tous les stades du développement embryonnaire alors que les milieux séquentiels sont plus proches des conditions physiologiques environnementales (Henry J. Leese 1998). Actuellement, il n'existe aucun consensus permettant d'identifier le milieu optimal pour le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste.

Dans notre étude, les milieux uniques (GTL de VITROLIFE et Sage de ORIGIO) améliorent significativement le taux de blastocystes par rapport aux milieux séquentiels avec plus de 90% des embryons qui se développent jusqu'au stade blastocyste (n=5462 embryons en culture prolongée) sans toutefois améliorer la qualité des blastocystes obtenus. Ces résultats sont concordants avec ceux de la littérature (Sepulveda et al. 2009 ; Sfontouris et al. 2016).

➡ L'absence de changement de milieu à J2 en maintenant des conditions de développement stables sans variation de température, de pH et sans manipulation permettrait d'améliorer le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste.

#### 5.1.6- Les conditions physiques de culture

Depuis plus de 15 ans, notre centre est équipé d'incubateurs 3 gaz permettant de travailler avec une teneur réduite en oxygène (5%). Cependant, si la teneur en oxygène est maîtrisée tant que l'incubateur est fermé, des modifications brutales de l'environnement, de développement peuvent survenir lors d'ouvertures trop fréquentes ou trop prolongées. En effet, la fréquence d'ouverture des incubateurs modifie les conditions de culture (gaz, température, pH...) et exerce donc un effet délétère sur le développement embryonnaire *in vitro* (Zhang et al. 2009). Cette fréquence d'ouverture est occasionnée par les observations des embryons à J1 et J2 des différents couples pris en charge à la même période ainsi que par les changements de milieux à J2.

Afin de réduire ce phénomène, notre laboratoire s'est équipé, depuis 2007 de cinq petits incubateurs permettant de limiter le nombre de boîtes de culture par incubateur et donc de limiter les ouvertures trop fréquentes engendrés par les observations. Nous avons montré que le taux de blastocystes est significativement plus élevé lors de l'utilisation de ces petits incubateurs par rapport aux incubateurs de 150L. Gardner et Lane expliquaient en 2001 que la

stabilité des milieux serait à l'origine de cette observation (Gardner et Lane ; 2001).

Depuis 2013, notre centre a acquis des caméras installées dans une étuve 150L 3 gaz, filmant en continu le développement embryonnaire, de la fécondation jusqu'au stade blastocyste. Cette technique nous permet d'observer les embryons sans ouvrir les étuves et donc permettre une stabilité environnementale optimale.

Notre étude a mis en évidence que l'utilisation de ce système minimisant les ouvertures de l'étuve améliore de façon significative le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste (90%).

 Afin de maximiser le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste, il est nécessaire de limiter les ouvertures intempestives des incubateurs afin de préserver un environnement optimal.

## 5.2- Quelle stratégie de transfert?

Au sein de notre centre, le taux de blastocystes est d'environ 60% en 2016, ce qui nous permet de proposer sereinement à nos couples de placer leurs embryons en culture prolongée afin de privilégier un transfert au stade blastocyste et donc d'optimiser le taux de grossesse.

Nous avons établi, dans notre laboratoire, une stratégie de transfert permettant de décider, en fonction de différents critères, le nombre d'embryons à transférer :


- Transfert d'un embryon ou blastocyste : femmes âgées de moins de 37 ans, ponction 1 et 2.
- Transfert de deux embryons ou de deux blastocystes : femmes âgées de 37 ans et plus ou ponction 3 et 4.

Afin d'évaluer cette stratégie de transfert, nous avons étudié l'impact de différents facteurs sur le devenir clinique des blastocystes.

### 5.2.1- Jour et stade d'expansion

La cinétique de développement du blastocyste influence le taux d'implantation. En effet, de nombreuses études ont montré que le transfert d'un blastocyste à J5 améliore significativement le taux d'implantation (Kovacic et al. 2004 ; Barrenetxea et al. 2005).

Par ailleurs, le taux de succès après transfert à J5 ou à J6 est aussi associé au degré d'expansion du blastocyste (Gardner et al. 2000 ; Shapiro et al. 2001 ; Poulsen et al. 2017). En cas de transfert unique chez les femmes âgées de moins de 37 ans, nous avons observé que les taux d'implantation les plus élevés concernaient les blastocystes expansés ou en début d'éclosion (B4-B5) quel que soit le jour du transfert avec des taux bien supérieurs lorsque le transfert s'effectuait à J5 plutôt qu'à J6 (57% lors du transfert de blastocystes B5 à J5 contre 35% lors du transfert de blastocystes B5 à J6). De même, les taux d'implantation sont similaires entre un blastocyste présentant un stade B1/B2 à J5 et un stade B5 à J6 (environ 35%).

 **Il est préférable de privilégier le transfert de blastocystes obtenus à J5 quel que soit le stade d'expansion. De même, il est préférable de privilégier le transfert de blastocystes expansés ou en début d'éclosion (B4-B5) quel que soit le jour du transfert.**

### 5.2.2- Trophectoderme et masse cellulaire interne

Ahlström et al a montré que l'aspect du trophectoderme à J5 a un impact positif sur le taux de grossesse clinique et le taux de naissance (Ahlström et al. 2011). Norwitz et al a mis en avant l'importance de la qualité du trophectoderme à ce stade du développement pour initier l'implantation (Norwitz et al. 2001). En effet, la sécrétion d'hCG par le trophectoderme jouerait un rôle important dans la communication entre le blastocyste et l'endomètre et permettrait d'améliorer l'implantation (Niswender et al. 2000 ;Van de Sompel et al. 2008). Il a été montré que l'hCG modulerait la réceptivité de l'endomètre et induirait une tolérance immunologique (Licht et al. 2001a,b; Tsampalas et al. 2010).

Dans notre étude, l'aspect du trophectoderme à J5 améliore significativement le taux de grossesse clinique par ponction. La morphologie combinée du blastocyste, associant l'aspect du trophectoderme et de la MCI, influence le taux de grossesse clinique par ponction mais un blastocyste de qualité médiocre a une probabilité, peut-être moindre mais non nulle, de s'implanter.

 La morphologie combinée des blastocystes à J5 comme aide à la décision biologique a des limites qu'il faut prendre en considération.

### 5.2.3- Rang de la ponction et âge de la patiente

Il a été rapporté depuis maintenant de nombreuses années que le taux de grossesse multiple était bien supérieur au cours des cycles obtenus par les techniques d'Aides Médicales à la Procréation que lors de cycles spontanés. En 2014, en France, la moyenne d'accouchements gémellaire après une prise en charge en AMP était d'environ 16% (rapport de l'agence de la biomédecine de 2014) contre moins de 2% en cycle spontané.

C'est pourquoi il est important d'adapter notre stratégie de transfert afin d'être optimum en terme de taux d'implantation et de grossesses cliniques tout en limitant le taux de grossesse multiple. En effet, ces grossesses multiples sont associées à un risque accru de morbi-mortalité maternelle, périnatale et néonatale (Land et Evers. 2003).

Dans notre centre, la stratégie de transfert d'un blastocyste unique s'est largement développée et est devenu systématique pour les femmes âgées de moins de 37 ans lors de la ponction 1 et 2. En revanche, pour les femmes âgées de 37 ans et plus ainsi que pour les ponctions 3 et 4, le transfert de 2 blastocystes est majoritaire malgré un taux de grossesse multiple plus important.


Berin et al a mis en évidence que le transfert de 2 blastocystes décongelés augmente le taux de grossesse clinique ainsi que le taux de grossesse gémellaire (Berin et al. 2011). Une récente étude a, quant à elle, montré que l'augmentation du nombre de blastocystes transférés en regard de l'âge de la femme n'améliore pas le taux de grossesse clinique mais augmente le taux de grossesse multiple (Alansari and Akande. 2015).

Dans notre étude, chez les femmes âgées de moins de 37 ans, le taux de grossesse clinique est similaire entre **le transfert d'un blastocyste au cours des ponction 1 et 2** et **le transfert de 2 blastocystes au cours des ponction 3 et 4** (environ 45%) avec des taux de grossesse multiple élevés avoisinant les 30%.

En ce qui concerne l'âge de la femme, le taux de grossesse clinique est également d'environ 45% chez les femmes de 37 ans et plus lors du transfert de 2 blastocystes quel que soit le rang de la ponction avec des taux de grossesse multiple avoisinant les 20%.

Selon les résultats de notre étude, afin d'obtenir des taux de grossesse clinique corrects avoisinant les 45%, il est préférable de transférer 2 blastocystes lors des ponctions 3 et 4 quel que soit l'âge de la patiente et de transférer 2 blastocystes lorsque la patiente est âgée de 37 ans et plus, quel que soit le rang de la ponction. Cependant, le risque de grossesses multiples est largement augmenté dans ce contexte.

Pour éviter ce risque de grossesses multiples, la stratégie de transfert d'un seul blastocyste quel que soit l'âge de la patiente et quel que soit le rang de la ponction serait la plus adaptée. Une étude récente portant sur le screening génétique préimplantatoire a montré que le taux de grossesse clinique est similaire lors du transfert d'un seul blastocyste euploïde et lors du transfert de deux blastocystes non testés chez des femmes âgées de moins de 42 ans (Forman et al. 2013). Il est actuellement admis que les femmes de 37 ans et plus ont un taux de blastocystes aneuploïdes plus important ce qui diminue les taux d'implantation par rapport aux femmes âgées de moins de 37 ans et donc leur chance de grossesses. Ce screening préimplantatoire permettrait de sélectionner les blastocystes euploïdes et donc de ne transférer qu'un seul blastocyste chez les femmes de 37 ans et plus et ainsi éviter le risque de grossesses multiples. Cependant, le screening des blastocystes préimplantatoire étant encore interdit en France, il est nécessaire d'adapter la stratégie de transfert à 2 blastocystes chez ces femmes afin d'optimiser leur chance de grossesse.

 Pour les femmes de moins de 37 ans, le transfert d'un blastocyste lors des ponctions 1 et 2 permet d'obtenir un taux de grossesse clinique convenable tout en limitant le risque de grossesses multiples. Lors des ponctions 3 et 4, le transfert de 2 blastocystes améliore le taux de grossesse clinique mais augmente le risque de grossesses multiples.

Pour les femmes de plus de 37 ans, quel que soit le rang de la ponction, le transfert de 2 blastocystes améliore le taux de grossesse clinique mais augmente le risque de grossesses multiples.

#### 5.2.4- Congélation de blastocystes au cours du cycle de la ponction

Certaines études ont montré que les cycles aboutissant à une grossesse clinique après transfert frais seraient prédictifs du succès des cycles suivants en transferts congelés (congélation lente) (Wang et al. 2001 ; El-Toukhy et al. 2003). La notion de cohorte embryonnaire homogène sur un même cycle en terme de qualité a été mise en avant afin d'expliquer ces résultats. Cette observation a été confirmée par l'étude de Berin qui a également montré que le taux de grossesse multiple augmentait lors du transfert de plus d'un embryon congelé sur les cycles suivants (Berin et al. 2010).

Dans une étude plus récente, l'équipe de Berin a étudié ces mêmes paramètres mais rapporté à des blastocystes congelés. Elle n'a pas mis en évidence de lien entre la réussite d'un cycle après transfert de blastocyste frais et la réussite des cycles suivant après transfert de blastocystes décongelés. Cependant, elle a montré que le transfert de deux blastocystes décongelés après l'échec du transfert d'un blastocyste frais augmente le risque de grossesses multiples (Berin et al. 2011).


Dans notre étude, nous avons observé le devenir clinique des blastocystes frais transférés en fonction de la présence ou non d'une congélation au cours du même cycle tout en prenant compte du nombre de blastocystes transférés chez les femmes de moins de 37 ans.

Le taux d'implantation est plus élevé lorsqu'une congélation est effectuée au cours du même cycle quel que soit le rang de la ponction.

En cas de ponction 1 ou 2, le taux d'implantation est significativement plus élevé lorsqu'une congélation est possible au cours du cycle de la ponction (52% vs 37%, significativement).

En cas de ponction 3 ou 4, le taux d'implantation est largement supérieur en cas de transfert de deux blastocystes ou un seul blastocyste (76% versus 52% et 52% vs 29%, respectivement) lorsqu'une congélation est effectuée sur le même cycle.

Ces observations pourraient être également expliquées par la notion de qualité embryonnaire homogène au sein d'une même cohorte permettant le transfert d'un blastocyste frais et la congélation des blastocystes surnuméraires.

 **Afin de limiter le taux de grossesse multiple, le transfert d'un seul blastocyste serait préférable lorsqu'une congélation est effectuée au cours du même cycle, quel que soit le rang de la ponction chez les femmes âgées de moins de 37 ans.**

### 5.3- La culture prolongée en systématique ?

Actuellement, de nombreuses études ont montré que le transfert frais au stade blastocyste améliore les taux d'implantation et de grossesses cliniques (Glujovsky et al. 2012).

Différentes hypothèses expliqueraient ces résultats : le génome embryonnaire humain s'active aux alentours du stade 4-8 cellules (Braude et al. 1988) et seuls les embryons ayant réalisé cette transition (génome maternel-génome embryonnaire) peuvent atteindre le stade blastocyste et s'implanter. De plus, il a été montré que les trompes et l'utérus apportent un environnement spécifique pour l'embryon en développement. Le transfert d'un embryon dans un site inhabituel du tractus génital féminin par rapport à son stade de développement pourrait induire des modifications métaboliques délétères pour sa viabilité (Gardner et al. 1998c). Le transfert au stade blastocyste serait donc plus physiologique et minimiserait l'exposition de l'embryon à cet environnement hostile (Check et al. 1995 ; Valbuena et al. 2001). Enfin, il a été démontré qu'une fréquence élevée de contractions utérines était associée à une réduction du taux de grossesse (Fanchin et al. 1998) et que la fréquence des contractions diminuait dans les jours suivant l'administration d'hCG (Fanchin et al. 2001). Le transfert à J5/J6 réduirait le risque d'expulsion de l'embryon hors de la cavité utérine.

Cependant, les intérêts du transfert au stade blastocystes sont contrebalancés par le risque d'absence de transfert qui représente une grande déception pour les couples pris en charge en AMP. En effet, la culture prolongée permet de sélectionner les embryons ayant le meilleur potentiel de développement mais n'améliore pas la qualité embryonnaire intrinsèque. Il a été admis que la moitié des embryons arrêtent leur développement du fait de ces anomalies intrinsèques (Staessen et al. 2004).

La décision du transfert au stade blastocyste s'effectue le plus souvent à J2 en fonction du nombre d'embryons obtenus et de leur qualité morphologique.

Dans notre centre, le taux de blastocystes avoisine actuellement les 60%, ce qui est tout à fait satisfaisant. Dans ce contexte, se pose la question de la mise en culture prolongée des cohortes totales de tous les couples pris en charge dans notre centre.

Dans mon étude, nous avons voulu évaluer l'impact biologique et clinique du transfert au stade blastocyste sur les taux de transfert, d'implantation et de grossesses cliniques en fonction de différents facteurs.

### 5.3.1- En fonction de la qualité des embryons à J2

Une étude récente a montré une corrélation positive entre l'aspect morphologique embryonnaire à J2 et J3 et le degré d'expansion des blastocystes obtenus (Figueira et al. 2013). De même, cette équipe a également mis en évidence qu'une stimulation plus faible associée à un recueil ovocytaire moins important améliorerait le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste.

Dans notre étude, le taux d'implantation diminue avec le nombre d'embryons 411 obtenus à J2 et l'âge des femmes. Le taux de transfert de blastocystes frais est supérieur à 95% lorsqu'au moins un embryon 411 est obtenu quels que soit l'âge de la femme et le rang de la ponction. Dans ce contexte, le transfert d'un seul blastocyste permet d'obtenir un taux de grossesse clinique similaire au transfert de 2 embryons mais le risque de grossesse multiple est, dans ce contexte, diminué.

➡ Si au moins un embryon 411 est disponible à J2, le transfert d'un blastocyste unique permet d'optimiser le taux de grossesse clinique tout en diminuant le risque de grossesse multiple avec un taux de transfert avoisinant les 95% quel que soit l'âge de la femme et le rang de la ponction.

En revanche, quand aucun embryon 411 n'est obtenu à J2, le taux de transfert au stade blastocyste est inférieur à 80%. Dans ce contexte, pour les couples au cours des ponctions 3 et 4, la mise en culture prolongée est compréhensible car ils sont souvent demandeurs de nouvelles stratégies. Pour les couples en début de parcours (ponctions 1 et 2), une absence de transfert est beaucoup plus difficile à accepter. Cependant, dans ce contexte et principalement pour les femmes âgées de moins de 37 ans, le transfert d'un blastocyste unique donne un taux de grossesse clinique par ponction supérieur au transfert d'un embryon et similaire au transfert de deux embryons mais avec un risque de grossesse multiple plus faible.

➡ Si aucun embryon 411 n'est obtenu à J2, le taux de transfert au stade blastocyste est inférieur à 80% quel que soit l'âge des femmes et le rang de la ponction mais le transfert d'un blastocyste unique donne un taux de grossesse similaire au transfert de deux embryons tout en diminuant le risque de grossesse multiple.

## 6- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La culture embryonnaire prolongée s'est largement développée depuis quelques années et a montré son efficacité en termes de taux d'implantation et de grossesses clinique. Cependant, le taux de transfert au stade blastocyste, bien qu'il soit relativement élevé, reste inférieur au taux de transfert au stade embryonnaire. En effet, il existe un risque d'arrêt de développement embryonnaire avec absence de blastocyste obtenu. Cette constatation est à l'origine de la réticence des biologistes, des cliniciens et des patients pour cette technique pourtant fort prometteuse. L'amélioration des conditions de culture, depuis ces dix dernières années, a permis d'obtenir des taux de blastocystes avoisinant les 80%. Certains facteurs, tels que les milieux et les conditions physiques de culture, sont encore à contrôler afin d'optimiser cette technique et permettre que son utilisation soit facilitée au sein d'un laboratoire d'AMP.

Nous avons décidé, dans notre centre, depuis janvier 2017, d'utiliser comme milieu de culture prolongée, un milieu unique exclusivement avec des boîtes de culture adaptée possédant 12 puits. Dans ce contexte, nous espérons améliorer le taux de blastocystes et ainsi envisager de placer en culture prolongée les embryons de tous les couples pris en charge dans notre centre afin d'optimiser nos taux de grossesse clinique et apporter une stratégie nouvelle aux patients en parcours d'infertilité. Le transfert pourrait donc s'effectuer exclusivement au stade blastocyste et les blastocystes surnuméraires de qualité suffisante seront vitrifiés. Cette dernière pratique est déjà mise en place dans notre centre. En effet, les embryons sont vitrifiés exclusivement au stade blastocyste avec des critères morphologiques stricts permettant d'assurer des taux de transfert après décongélation élevés. Devant les résultats de notre étude, cette stratégie permettrait d'optimiser les taux d'implantation et de grossesse clinique tout en présentant un taux de transfert proche des 90% quand au moins un embryon 411 est disponible à J2.

Notre priorité est également de limiter le taux de grossesse multiple, fortement augmenté lors du transfert de deux blastocystes et qui est à l'origine de risques de morbi-mortalité maternelle, périnatale et néonatale. C'est pourquoi, la stratégie de transfert adoptée doit être optimale afin d'obtenir des taux de grossesses cliniques suffisants tout en minimisant au maximum les grossesses multiples. Actuellement, la stratégie de transfert au stade blastocystes employée dans notre centre semble satisfaisante :

- femmes de moins de 37 ans et ponctions de rang 1 ou 2 : transfert d'un blastocyste

- femmes de 37 ans et plus ou ponctions de rang 3 ou 4 : transfert de deux blastocystes.

Les taux de grossesse multiple restent bien contrôlés mais toujours supérieurs aux taux de grossesse multiple retrouvés dans la population générale. Afin d'y

remédier, le transfert de blastocyste unique chez les femmes âgées de moins de 37 ans pourrait donc s'élargir en évitant de tenir compte du rang de la ponction mais en privilégiant l'aspect morphologique de la cohorte de blastocystes obtenue qui est corrélé positivement aux taux d'implantation.

La culture prolongée est un outil permettant de réduire le nombre d'embryons transférés. La proposer à tous les couples expose cependant à un risque d'augmentation d'absence de transfert. Ce risque peut être diminué si les conditions de culture sont optimales.

L'impact du taux de grossesse par ponction reste cependant à évaluer pour envisager de proposer cette stratégie à tous les couples pris en charge en AMP. Il serait également intéressant d'essayer d'identifier les femmes à risque de grossesse multiple afin d'adapter au mieux cet outil en fonction des différents profils de patients rencontrés en parcours d'infertilité.

## 7- BIBLIOGRAPHIE

- Alansari L, Akande V. (2015). How to maximize the pregnancy rate with no increase in multiple pregnancy rates following blastocyst embryo transfer? Is blastocyst transfer time the missing ingredient? *Middle East Fertil Soc J.* 2015;20:241-245.
- Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. (1999). Human embryo fragmentation *in vitro* and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril.* 1999 May;71(5):836-42.
- Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. (2000). Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod.* 2000 Dec;15(12):2634-43.
- Asch R, Simerly C, Ord T, Ord VA, Schatten G. (1995). The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. *Hum Reprod.* 1995 Jul;10(7):1897-906.
- Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Mercan R, Aksoy S, Nuhoglu A. (2001). Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated, epididymal or testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 2001 Jan;16(1):125-129.
- Baltz JM, Biggers JD, Lechene C. (1990). Apparent absence of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity in the two-cell mouse embryo. *Dev Biol.* 1990 Apr;138(2):421-9.
- Baltz JM, Biggers JD, Lechene C. (1991). Two-cell stage mouse embryos appear to lack mechanisms for alleviating intracellular acid loads. *J Biol Chem.* 266, 6052-6057
- Barrenetxea G, López de Larruzea A, Ganzabal T, Jiménez R, Carbonero K, Mandiola M. (2005). Blastocyst culture after repeated failure of cleavage-stage embryo transfers: a comparison of day 5 and day 6 transfers. *Fertil Steril.* 2005 Jan;83(1):49-53.
- Bavister B. (2004). Oxygen concentration and preimplantation development. *Reprod Biomed Online.* 2004 Nov;9(5):484-6.
- Berin I, Engmann LL, Benadiva CA, Schmidt DW, Nulsen JC, Maier DB. (2010) Transfer of two versus three embryos in women less than 40 years old

undergoing frozen transfer cycles. *Fertil Steril*. 2010 Feb;93(2):355-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.01.101. Epub 2009 Mar 26.

- Berin I, McLellan ST, Macklin EA, Toth TL, Wright DL. (2011). Frozen-thawed embryo transfer cycles: clinical outcomes of single and double blastocyst transfers. *J Assist Reprod Genet*. 2011;28:575-581.

- Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M. (2007). Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Oct 17;(4):CD002118.

- Braga DP, Setti AS, de Cássia S Figueira R, Machado RB, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. (2012). Patient selection criteria for blastocyst transfers in extended embryo culture programs. *J Assist Reprod Genet*. 2012 Dec;29(12):1357-62. doi: 10.1007/s10815-012-9875-y. Epub 2012 Oct 11.

- Braga DP, Setti AS, Vingris L, Figueira RC, Iaconelli A, Borges E. (2013). The male factor of infertility should not be an issue for the selection of patients for extended embryo culture programmes. *Andrology*. 2013 Sep;1(5):758-63. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00112.x. Epub 2013 Jul 10.

- Braga DP, Setti AS, Figueira RC, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. (2014). The importance of the cleavage stage morphology evaluation for blastocyst transfer in patients with good prognosis. *J Assist Reprod Genet*. 2014 Aug;31(8):1105-10. doi: 10.1007/s10815-014-0266-4. Epub 2014 Jun 4.

- Braude P1, Bolton V, Moore S. (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*. 1988 Mar 31;332(6163):459-61.

- Brown JJ, Whittingham DG. (1991). The roles of pyruvate, lactate and glucose during preimplantation development of embryos from F1 hybrid mice *in vitro*. *Development*. 1991 May;112(1):99-105.

- Byatt-Smith, H.J. Leese and R.G. Gosden (1991). An investigation by mathematical modelling of whether mouse and human preimplantation embryos in static culture can satisfy their demands for oxygen by diffusion. *Hum Reprod*. 1991 Jan;6(1):52-7.

- Catalá MG, Izquierdo D, Rodríguez-Prado M, Hammami S, Paramio MT.(2012). Effect of oocyte quality on blastocyst development after *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a sheep model. *Fertil Steril*. 97(4):1004-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.12.043

- Check JH, O'Shaughnessy A, Lurie D, Fisher C, Adelson HG. (1995). Evaluation of the mechanism for higher pregnancy rates in donor oocyte recipients by comparison of fresh with frozen embryo transfer pregnancy rates in a shared oocyte programme. *Hum Reprod.* 1995 Nov;10(11):3022-7
- Croteau S, Ménezo Y. (1994). Les facteurs de croissance : de la maturation ovocytaire au blastocyste. *Contracept. Fert. Sex.* 1994, 22 : 648-655.
- Dale B, Menezo Y, Cohen J, DiMatteo L, Wilding M. (1998). Intracellular pH regulation in the human oocyte. *Hum Reprod.* 13, 964-970. doi: 10.1093/HUMREP/13.4.964
- Dumoulin JC, Meijers CJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JP, Evers JL. (1999). Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. *Hum Reprod.* 1999 Feb;14(2):465-9.
- Dumoulin JC, Coonen E, Bras M, van Wissen LC, Ignoul-Vanvuchelen R, Bergers-Jansen JM, Derhaag JG, Geraedts JP, Evers JL. (2000). Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2000 Feb;15(2):402-9.
- Eftekhari-Yazdi P, Valojerdi MR, Ashtiani SK, Eslaminejad MB, Karimian L. (2006). Effect of fragment removal on blastocyst formation and quality of human embryos. *Reprod Biomed Online.* 2006 Dec;13(6):823-32.
- El-Toukhy T, Khalaf Y, Al-Darazi K, O'Mahony F, Wharf E, Taylor A, Braude P. (2003). Cryo-thawed embryos obtained from conception cycles have double the implantation and pregnancy potential of those from unsuccessful cycles. *Hum Reprod.* 2003 Jun;18(6):1313-8.
- Fanchin R, Ayoubi JM, Righini C, Olivennes F, Schönauer LM, Frydman R. (2001). Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. *Hum Reprod.* 2001 Jun;16(6):1115-9.
- Figueira R.C.S., Braga D.P.A.F., Setti A.S., Iaconelli Jr. A., Borges Jr.E. (2013). Selection of patients for extended embryo culture programmes. *Fertility and Sterility* 2013 100:3 SUPPL.1 (S244).

- Flynn TH, Hillman NJ. (1980). The metabolism of exogenous fatty acids by preimplantation mouse embryos developing *in vitro*. *Embryol.Exp.Morphol.* 1980, 56: 157-168.
- Fong B, Watson PH, Watson AJ. (2007). Mouse preimplantation embryo responses to culture medium osmolarity include increased expression of CCM2 and p38 MAPK activation. *BMC Dev Biol.* 7, 2. doi: 10.1186/1471-213X-7-2
- Forman EJ, Hong KH, Ferry KM, Tao X, Taylor D, Levy B, et al. (2013). *In vitro* fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2013;100:100-107.e1
- Fragouli E, Wells D, Delhanty JD. (2011). Chromosome abnormalities in the human oocyte. *Cytogenet Genome Res.* 2011;133(2-4):107-18. doi: 10.1159/000323801. Epub 2011 Jan 28.
- Gardner DK, Lane M. (1993). Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod.* 48, 377-385. doi: 10.1095/BIOLREPROD48.2.377
- Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. (1998). A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1998 Dec;13(12):3434-40.
- Gardner, D.K., Lane, M., and Schoolcraft, W.B. (2000a). Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum. Reprod.* 15 (Suppl.6), 9-23. doi: 10.1093/15.3.694
- Gardner, D.K., Pool, T.B., and Lane, M. (2000b). Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. *Semin. Reprod. Med.* 18, 205-218. doi: 10.1055/S-2000-12559
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. (2000). Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 2000 Jun;73(6):1155-8.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. (2001). Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril.* 2001 Dec;76(6):1175-80.
- Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A. (2012). Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane*

- Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, Royere D. (2007). Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod.* 2007 Jul;22(7):1973-81. Epub 2007 May 11.
- Guerif F, Lemseffer M, Bidault R, Gasnier O, Saussereau MH, Cadoret V, Jamet C, Royere D. (2009a). Single Day 2 embryo versus blastocyst-stage transfer: a prospective study integrating fresh and frozen embryo transfers. *Hum Reprod.* 2009 May;24(5):1051-8. doi: 10.1093/humrep/dep018. Epub 2009 Feb 13.
- Guerif F, Lemseffer M, Leger J, Bidault R, Cadoret V, Chavez C, Gasnier O, Saussereau MH, Royere D. (2010). Does early morphology provide additional selection power to blastocyst selection for transfer? *Reprod Biomed Online.* 2010 Oct;21(4):510-9. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.06.043.
- Hadi T, Hammer MA, Algire C, Richards T, Baltz JM. (2005). Similar effects of osmolarity, glucose, and phosphate on cleavage past the 2-cell stage in mouse embryos from outbred and F1 hybrid females. *Biol Reprod.* 72, 179-187. doi :10.1095/BIOLREPROD.104.033324
- Hamatani T, Ko MSh, Yamada M, Kuji N, Mizusawa Y, Shoji M, Hada T, Asada H, Maruyama T, Yoshimura Y. (2006). Global gene expression profiling of preimplantation embryos. *Hum Cell.* 2006 Aug;19(3):98-117.
- Hardy K, Stark J, Winston RM. (2003). Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos. *Biol Reprod.* 2003 Apr;68(4):1165-9. Epub 2002 Oct 31.
- Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT, Thompson JG. (2004). Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol Reprod.* 2004 Oct;71(4):1108-19. Epub 2004 May 26.
- Henry J. Leese (1998). Human Embryo Culture: Back to Nature. *J Assist Reprod Genet.* 1998 Sep; 15(8): 466-468.  
doi: 10.1023/A:1022526219202 PMCID: PMC3455049

- Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ, Leese HJ. (1996). Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol Reprod Dev.* 1996 Aug;44(4):476-85.
  
- Iwata H, Minami N, Imai H. (2000). Postnatal weight of calves derived from *in vitro* matured and *in vitro* fertilized embryos developed under various oxygen concentrations. *Reprod Fertil Dev.* 2000;12(7-8):391-6.
  
- Janny L, Menezo YJ. (1994). Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev.* 1994 May;38(1):36-42.
  
- Jousan FD, Hansen PJ. (2007) Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling. *Mol Reprod Dev.* 74, 189-196. doi : 10.1002/MRD.20527
  
- Karja NW, Wongsrikeao P, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T, Otoi T. (2004). Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine *in vitro* fertilized embryos. *Theriogenology.* 2004 Dec;62(9):1585-95.
  
- Kimmel GL, Williams PL, Claggett TW, Kimmel CA. (2002). Response-surface analysis of exposure-duration relationships: the effects of hyperthermia on embryonic development of the rat *in vitro*. *Toxicol Sci.* 69, 391-399. doi :10.1093/TOXSCI/69.2.391
  
- Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M, Cizek-Sajko M. (2004). Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reprod Biomed Online.* 2004 Jun;8(6):687-94.
  
- Kolibianakis, C. Bourgain, C. Albano, K. Osmanagaoglu, J. Smitz, A. Van Steirteghem, P. Devroey (2002). Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil. Steril,* 78 (2002), pp. 1025-1029.
  
- Kovacic B, Vlaisavljević V. (2008). Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts *in vitro*: a prospective study on sibling oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2008 Aug;17(2):229-36.

- Kwon HC, Yang HW, Hwang KJ, Yoo JH, Kim MS, Lee CH, Ryu HS, Oh KS. (1999). Effects of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured *in vitro*. *J Obstet Gynaecol Res*. 1999 Oct;25(5):359-66.
  
- Land JA, Evers JL. (2003). Risks and complications in assisted reproduction techniques: Report of an ESHRE consensus meeting. *Hum Reprod*. 2003 Feb;18(2):455-7.
  
- Lane M, Baltz JM, Bavister BD. (1998). Regulation of intracellular pH in hamster preimplantation embryos by the sodium hydrogen (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>) antiporter. *Biol Reprod*. 59, 1483-1490. doi : 10.1095/BIOLREPROD59.6.1483
  
- Lane M, Gardner DK. (2003). Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod*. 69, 1109-1117. doi : 10.1095/BIOLREPROD.103.018093
  
- Lane M, Gardner DK. (1994). Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *J Reprod Fertil*. 1994 Nov;102(2):305-12.
  
- Lane M, Hooper K, Gardner DK. (2001). Effect of essential amino acids on mouse embryo viability and ammonium production. *J Assist Reprod Genet*. 2001 Sep;18(9):519-25.
  
- Lane M, Mitchell M, Cashman KS, Feil D, Wakefield S, Zander-Fox DL. (2008). To QC or not to QC: the key to a consistent laboratory? *Reprod Fertil Dev*.
  
- Leoni GG, Rosati I, Succu S, Bogliolo L, Bebbere D, Berlinguer F, Ledda S, Naitana S. (2007). A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation of *in vitro* produced ovine blastocysts. *Reprod Domest Anim*. Jun;42(3):299-304.
  
- Li J, Foote RH (1996). Differential sensitivity of one-cell and two-cell rabbit embryos to sodium chloride and total osmolarity during culture into blastocysts. *J Reprod Fertil*. 108, 307-312
  
- Licht P, Russu V, Lehmeyer S, Wildt L. (2001). Molecular aspects of direct LH/hCG effects on human endometrium--lessons from intrauterine microdialysis in the human female in vivo. *Reprod Biol*. 2001 Jul;1(1):10-9.

- Lighten AD, Moore GE, Winston RM, Hardy K. (1998). Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture. *Hum Reprod.* 1998 Nov;13(11):3144-50.
- Ménézo Y, Barak Y (2000). Comparison between day-2 embryos obtained either from ICSI or resulting from short insemination IVF: influence of maternal age. *Hum Reprod.* 2000 Aug;15(8):1776-80.
- McKiernan SH, Bavister BD. (1990). Environmental variables influencing *in vitro* development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol Reprod.* 43, 404-413. doi : 10.1095/BIOLREPROD43.3.404
- Miller JE, Smith TT. (2001). The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development *in vitro*. *Hum Reprod.* 2001 May;16(5):918-24.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, Cohen J, Sable D. (2003). Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online.* 2003 Jul-Aug;7(1):91-7.
- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 2000 Jan;80(1):1-29.
- Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.* 2001 Nov 8;345(19):1400-8.
- Orsi NM, Leese HJ. (2004). Ammonium exposure and pyruvate affect the amino acid metabolism of bovine blastocysts *in vitro*. *Reproduction.* 127, 131-140. doi : 10.1530/REP.1.00031
- Palermo GD, Schlegel PN, Hariprashad JJ, Ergün B, Mielnik A, Zaninovic N, Veeck LL, Rosenwaks Z. (1999). Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum Reprod.* 1999 Mar;14(3):741-8.
- Pantaleon M, Scott J, Kaye PL. (2007). Nutrient sensing by the early mouse embryo: hexosamine biosynthesis and glucose signaling during preimplantation development. *Biol Reprod.* 2008 Apr;78(4):595-600. Epub 2007 Nov 28.

- Pantos K, Athanasiou V, Stefanidis K, Stavrou D, Vaxevanoglou T, Chronopoulou M. (1999). Influence of advanced age on the blastocyst development rate and pregnancy rate in assisted reproductive technology. *Fertil Steril*. 1999 Jun;71(6):1144-6.
- Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, Devroey P. (2006). *In vitro* fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *N Engl J Med*. 2006 Mar 16;354(11):1139-46.
- Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, Venetis CA, Fatemi H, Tarlatzis B, Devroey P. (2007). Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2008 Jan;23(1):91-9. Epub 2007 Oct 26.
- Paria BC, Dey SK. (1990). Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and the role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990, 87: 4756-4760.
- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. (1990). Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril*. 85, 526-528. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2005.10.018
- Poulsen V, Ingerslev HJ, Kirkegaard K. (2017). Elective embryo transfers on Day 6 reduce implantation compared with transfers on Day 5. *Hum Reprod*. 2017 Apr 7:1-6. doi: 10.1093/humrep/dex059. [Epub ahead of print]
- Pratt HM. (1980). Phospholipid synthesis in the preimplantation mouse embryo. *J. Reprod. Fertil*. 1980, 58: 237-248.
- Pratt HM. Preimplantation mouse embryos synthesize membrane sterols. (1982). *Devl. Biol*. 1982, 89: 101-110
- Rhenman A, Berglund L, Brodin T, Olovsson M, Milton K, Hadziosmanovic N, Holte J. (2014). Which set of embryo variables is most predictive for live birth? A prospective study in 6252 single embryo transfers to construct an embryo score for the ranking and selection of embryos. *Hum Reprod*. 2015 Jan;30(1):28-36. doi: 10.1093/humrep/deu295. Epub 2014 Nov 5.
- Rooke JA, McEvoy TG, Ashworth CJ, Robinson JJ, Wilmut I, Young LE, Sinclair KD. (2007). Ovine fetal development is more sensitive to perturbation by the

presence of serum in embryo culture before rather than after compaction. *Theriogenology* 67, 639-647. doi : 10.1016/J.THERIGENOLOGY.2006.09.040

- Sepúlveda S, Garcia J, Arriaga E, Diaz J, Noriega-Portella L, Noriega-Hoces L. (2009). *In vitro*

development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. *Fertil Steril*. 2009 May;91(5):1765-70. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.02.169. Epub 2008 Apr 25.

- Sfontouris IA,, Kolibianakis EM, Lainas GT1, Petsas GK, Tarlatzis BC3, Lainas TG. (2016). Blastocyst Development in a Single Medium Compared to Sequential Media. *Reprod Sci*. 2017 Jan 1:1933719116687653. doi: 10.1177/1933719116687653. [Epub ahead of print]

- Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. (2001). A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. *Fertil Steril*. 2001 Jun;75(6):1126-30.

- Sjöblom P, Menezes J, Cummins L, Mathiyalagan B, Costello MF. (2006). Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics. *Fertil Steril*. 2006 Oct;86(4):848-61.

- Steeves CL, Baltz JM. (2005). Regulation of intracellular glycine as an organic osmolyte in early preimplantation mouse embryos. *J Cell Physiol*. 204, 273-279. doi : 10.1002/JCP.20284

- Sugiyama S, McGowan M, Phillips N, Kafi M, Young M. (2007). Effects of increased ambient temperature during IVM and/or IVF on the *in vitro* development of bovine zygotes. *Reprod Domest Anim*. 42, 271-274. doi : 10.1111/J.1439-0531.2006.00779.X

- Tsampalas M, Gridelet V, Berndt S, Foidart JM, Geenen V, Perrier d'Hauterive S. (2010). Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J Reprod Immunol*. 2010 May;85(1):93-8. doi: 10.1016/j.jri.2009.11.008. Epub 2010 Mar 15.

- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. (2004). Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2004 Dec;19(12):2849-58. Epub 2004 Oct 7.

- Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, Tao X, Treff NR. (2013). Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening

and fresh embryo transfer significantly increases *in vitro* fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2013 Sep;100(3):697-703. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.035. Epub 2013 Jun 1.

- Thomas MR, Sparks AE, Ryan GL, Van Voorhis BJ. (2009). Clinical predictors of human blastocyst formation and pregnancy after extended embryo culture and transfer. *Fertil Steril*. 2010 Jul;94(2):543-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.03.051. Epub 2009 May 5.

- Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, McMillan WH, Tervit HR. (1995). Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod*. 53, 1385-1391. doi : 10.1095

- Valbuena D, Martin J, de Pablo JL, Remohí J, Pellicer A, Simón C. (2001). Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. *Fertil Steril*. 2001 Nov;76(5):962-8.

-Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. (2001). A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos. *Hum Reprod*. 2001 Apr;16(4):719-29.

- Van de Sompel D, Brady M. (2008). A systematic performance analysis of the simultaneous algebraic reconstruction technique (SART) for limited angle tomography. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2008;2008:2729-32. doi: 10.1109/IEMBS.2008.4649766.

- Van Landuyt L, De Vos A, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. (2005). Blastocyst formation in *in vitro* fertilization versus intracytoplasmic sperm injection cycles: influence of the fertilization procedure. *Fertil Steril*. 2005 May;83(5):1397-403.

- Van Soom A, Yuan YQ, Peelman LJ, de Matos DG, Dewulf J, Laevens H, de Kruif A. (2002). Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology*. 2002 Mar 15;57(5):1453-65.

- Virant-Klun I, Tomazevic T, Vrtacnik-Bokal E, Vogler A, Krsnik M, Meden-Vrtovec H. (2006). Increased ammonium in culture medium reduces the development of human embryos to the blastocyst stage. *Fertil Steril*. 85, 526-528. doi: 10.1016/J.FERTNSTERT.2005.10.018

- Wakayama S, Thuan NV, Kishigami S, Ohta H, Mizutani E, Hikichi T, Miyake M, Wakayama T. (2004). Production of offspring from one-day-old oocytes stored at room temperature. *J Reprod Dev.* 50, 627-637. doi : 10.1262/JRD.50.627
- Wang JX, Yap YY, Matthews CD. (2001). Frozen-thawed embryo transfer: influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception. *Hum Reprod.* 2001 Nov;16(11):2316-9.
- Waldenström U, Engström AB, Hellberg D, Nilsson S. (2008). Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertil Steril.* 2009 Jun;91(6):2461-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.03.051. Epub 2008 Jun 12.
- Wilson M, Hartke K, Kiehl M, Rodgers J, Brabec C, Lyles R. (2002). Integration of blastocyst transfer for all patients. *Fertil Steril.* 2002 Apr;77(4):693-6.
- Zander DL, Thompson JG, Lane M. (2006). Perturbations in mouse embryo development and viability caused by ammonium are more severe after exposure at the cleavage stages. *Biol.Reprod.* 74, 288-294. doi : 10.1095/BIOLREPROD.105.046235
- Zhang JQ, Li XL, Wu X, Ling XF, Cao SR, Chen J, Wang P, Yan S, Guo X, Rong S, Heng BC, Tong GQ. Reduction in the frequency of microscopic examination of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and increases blastocyste formation rate. *RBM Online.* Article in press. Apr 2009
- Zech NH, Lejeune B, Puissant F, Vanderzwalmen S, Zech H, Vanderzwalmen P. (2007). Prospective evaluation of the optimal time for selecting a single embryo for transfer: day 3 versus day 5. *Fertil Steril.* 2007 Jul;88(1):244-6. Epub 2007 Feb 8.
- Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T. (2002). The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod.* 2002 May;17(5):1327-33.





Vu, le Directeur de Thèse  
Tours, le

Vu, le Doyen  
De la Faculté de Médecine de Tours  
Tours, le



## MAUROY Charlotte

93 pages – 14 tableaux – 29 figures.

### Résumé :

**Introduction :** La culture embryonnaire prolongée jusqu'au stade blastocyste est une aide pour la sélection des embryons les plus viables. Elle est devenue une technique de routine dans notre laboratoire. Son optimisation permettrait d'étendre cette pratique à tous les couples pris en charge en AMP tout en adaptant la stratégie de transfert de blastocystes.

**Matériel et Méthode :** Notre travail a consisté à faire l'état des lieux de la culture embryonnaire prolongée au sein du centre d'AMP du CHRU de Tours entre janvier 2006 et décembre 2016. Cette étude a été réalisée sur des cohortes embryonnaires totales incluant 26850 embryons mis en culture prolongée et a permis d'évaluer différents facteurs pouvant influencer leur développement et leur devenir clinique.

**Résultats :** L'amélioration des conditions de culture a permis une augmentation du taux de blastocystes depuis la mise en place de la culture embryonnaire prolongée sur cohorte totale. Le taux de blastocystes est influencé par la cinétique de développement et l'aspect morphologique à J2, l'âge des femmes, les conditions et les milieux de culture. La stratégie de transfert doit prendre en compte le jour et le stade d'expansion du blastocyste, l'aspect morphologique de la cohorte de blastocystes obtenue, l'âge de la femme et le rang de la ponction. L'organisation cellulaire des blastocystes à J5/J6 peut être une aide à la décision de transfert mais ses limites doivent être prises en considération. La décision de mise en culture prolongée de la cohorte embryonnaire peut être influencée par le nombre d'embryons 411 disponibles à J2. En effet, si au moins un embryon 411 est obtenu à J2, le taux de grossesse clinique par ponction lors du transfert d'un blastocyste unique est optimum avec un taux de transfert avoisinant les 95%. Si aucun embryon 411 n'est obtenu à J2, le taux de transfert au stade blastocyste est inférieur à 80%. Cependant, le transfert d'un blastocyste unique améliore le taux de grossesse clinique par ponction versus le transfert d'un embryon unique (34% vs 25%, respectivement). Il est similaire au taux de grossesse clinique par ponction lors du transfert de deux embryons mais il permet une diminution du risque de grossesses multiples.

**Conclusion :** La culture prolongée est un outil permettant de réduire le nombre d'embryons transférés. La proposer à tous les couples expose cependant à un risque d'augmentation d'absence de transfert. Ce risque peut être diminué si les conditions de culture sont optimales. L'impact du taux de grossesse par ponction reste à évaluer pour envisager de proposer cette stratégie à tous les couples pris en charge en AMP.

**Mots clés :** Blastocyste, Culture prolongée, Taux de transfert, Taux d'implantation, Taux de grossesse clinique, Taux de blastocystes.

### Jury :

Président du Jury : Professeur Dominique ROYERE

Directeur de thèse : Professeur Fabrice GUERIF

Membres du Jury : Professeur Henry MARRET  
Professeur Karine MAHEO  
Docteur Marion CORNUAU

Date de soutenance : 13 juin 2017