

**ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS
UNIVERSITÉ DE TOURS**

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2020

N° 58

**MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE
TENANT LIEU DE THÈSE D'EXERCICE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Par**

SAINTE-ROSE Romane

Née le 1 novembre 1993 à Angers (49)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 22 OCTOBRE 2020

**IMPACT DE L'ÂGE DE LA FEMME SUR LE
DEVENIR BIOLOGIQUE ET CLINIQUE DES
EMBYRONS MIS EN CULTURE PROLONGÉE**

JURY

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

Membres :

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

Docteur Cynthia FRAPSAUCE, 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

ANNEE : 2019 - 2020

Directrice : Pr Véronique MAUPOIL

Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS

Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN

ENSEIGNANTS

17 PROFESSEURS

ALLOUCHI	Hassan	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
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	PHARMACOGNOSIE
GIRAUDEAU	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

2 PROFESSEURS EMERITES

AGAFONOV	Viatcheslav	CHIMIE PHYSIQUE
GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES

38 MAITRES DE CONFERENCES

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BOUDESOCQUE-DELAIE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE

**DELAYE
DENEVAULT
DOUZIECH-EYROLLES
DUMAS
GERMON
GLEVAREC
HERVE-AUBERT
JUSTE
LAJOIE
LANOUE
MARC
MARCHAIS
MAVEL
MUNNIER
OMBETTA-GOKA
OUDIN
PASQUALIN
PRIE
RESPAUD
SOUCE
TAUBER
VELGE-ROUSSEL
VERCOUILLIE
VERGOTE
VIERRON
ZHANG**

**Pierre-Olivier
Caroline
Laurence
Jean-François
Stéphanie
Gaëlle
Katel
Matthieu
Laurie
Arnaud
Jillian
Hervé
Sylvie
Emilie
Jean-Edouard
Audrey
Côme
Gildas
Renaud
Martin
Clovis
Florence
Johnny
Jackie
Emilie
Bei-Li**

CHIMIE THERAPEUTIQUE
CHIMIE THERAPEUTIQUE
AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
PHARMACIE GALENIQUE
CHIMIE THERAPEUTIQUE
PHARMACIE GALENIQUE
CHIMIE ORGANIQUE
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PHARMACOLOGIE
CHIMIE ORGANIQUE
CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
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

3 AHU

**FOUCAULT
FOUCAULT-FRUCHARD
MARLET**

**Amélie
Laura
Julien**

HEMATOLOGIE
PHARMACIE CLINIQUE
MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

4 ATER

**BILLET
DRIOUCH
LAKHRIF
VERGES**

**Kevin
Abderrazzak
Zineb
Valentin**

BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
FORMATIONS BIO3 INSTITUTE
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

***D'**honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;*

***D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

***De** ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;*

***En** aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;*

***De** ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;*

***De** faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;*

***De** coopérer avec les autres professionnels de santé ;*

***Que** les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.*

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Fabrice GUERIF, je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant d'encadrer ce travail, pour vos multiples conseils et pour toutes les heures consacrées à diriger cette thèse avec toujours autant d'intérêt. Vos enseignements clairs et précis et votre souci de la méthode et du travail bien fait, resteront pour moi un exemple à suivre. C'est un honneur et une grande chance de pouvoir apprendre auprès de vous. Vous me permettez d'accéder à une formation de grande qualité en Médecine et Biologie de la Reproduction. Soyez assuré de ma profonde gratitude et de mon admiration.

Madame le Professeur Karine MAHEO, vous me faites l'honneur de présider ma thèse et de juger mon travail. Je vous remercie de l'intérêt que vous portez à mon travail. 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. Merci de me transmettre tes connaissances cliniques essentielles à ma pratique future.

Madame le Docteur Cynthia FRAPSAUCE, merci. Pour beaucoup, mais surtout pour ton exemplarité. Avancer avec toi est très constructif, tant en connaissances sur la biologie de la reproduction qu'en tant que personne. Tu m'apportes les connaissances pratiques et théoriques qui me permettront d'exercer cette profession avec qualité. J'ai beaucoup de chance de pouvoir apprendre à tes côtés et je suis ravie que cela puisse continuer. Merci de me faire confiance.

Les cliniciens, Judith COUDERCHET, Olivia GERVEREAU, Lionel HOMER, Mathilde KAPPELI, Michel LANOUE, Véronique RACT, Jacques SANGWANN, je vous remercie pour votre disponibilité, et votre bonne humeur. Merci d'avoir eu la patience de répondre à toutes mes questions concernant la clinique. Vos expériences et vos connaissances professionnelles seront essentielles pour moi.

Les techniciens, Armoni, Chantal, Charline, Mélanie, Olivier et Rachel, je vous remercie de me transmettre, avec patience, toutes vos connaissances pratiques et théoriques. Vous me permettez, en me transmettant votre savoir et votre technique, de devenir une future biologiste organisée, rigoureuse et passionnée. Merci pour l'ambiance scientifique et amicale qui règne au laboratoire. Merci pour votre gentillesse, et les moments de rire et de bonheur que je passe avec vous. Vous avoir à mes côtés dans mon cursus d'interne est un privilège.

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

Maryline et les secrétaires cliniques, merci pour la gaieté et la bonne humeur que vous apportez au sein du service.

A mes co-internes devenus des amis, Caroline, Adelaïde, Victoria, Justine, Claire, Laura, Marine et Soum. Merci pour ces moments de partage, de rire, et de bonne humeur. Travailler quotidiennement avec vous est aussi agréable que votre amitié. Merci d'avoir rendu ces années d'internat tellement drôles et agréables.

A Lisa, ma lil'fauch, à nos souvenirs tourangeaux, nos heures interminables à blablater et à rire, nos tea-pot trinqués.. Il m'est difficile de mettre des mots sur notre amitié, cette connexion instantanée et si évidente. Merci d'être le soleil de ma vie.

A mes amis les plus proches, Julie, Mélanie, Milou, Manon, Cyndie, Ophélie, Mégane, Hélène et Mathilde. J'ai tellement de chance de vous avoir avec moi depuis toutes ces années. Votre amitié m'est très chère. Merci pour votre amour et votre présence.

A mes beaux-parents, merci de m'avoir appris que la famille ne s'arrêtait pas aux liens du sang. Vous m'avez, sans vous en rendre compte, inculquer beaucoup de valeurs. Merci pour tout ce que vous avez fait et faites toujours pour moi.

A Angéline et Sarah et à nos jolis souvenirs d'enfance. Nos chemins n'ont pas toujours pris la même direction, mais j'ai toujours pu compter sur votre soutien quand j'en avais besoin, merci pour ça et pour beaucoup d'autres choses encore.

A ma maman, merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir sans cesse soutenue durant ces longues années d'études, merci pour les sacrifices que tu as fait, l'amour et le soutien que tu m'as toujours apporté. J'espère que tu es fière de moi aujourd'hui.

A Julien, tu es l'histoire de ma vie, mon compagnon et mon meilleur ami. 11 ans que tu es dans ma vie, 11 ans que je me dis que c'est ce qui m'est arrivé de mieux. Merci d'avoir toujours cru en moi. Merci pour ta patience face à l'investissement que représentent mes études. Merci de prendre soin de moi et de m'aimer comme tu fais. Merci, pour absolument tout. Je t'aime.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures	1
Liste des tableaux	3
Abréviations.....	4
Introduction.....	5
I- L'Âge.....	6
A) Désir retardé de grossesse	6
1) Épidémiologie générale	6
2) Raisons de ces maternités tardives	7
3) Âge maternel et assistance médicale à la procréation	8
4) Conséquences de ces désirs tardifs	9
4.1 - Fertilité, chance de grossesse et âge de la femme.....	9
4.2 - Complications obstétricales et âge de la femme	10
4.3 - Complications pour l'enfant.....	13
4.4 - Âge seuil.....	15
4.1.1 – Réglementation.....	15
4.1.2 – Stratégie de transfert.....	15
B) Le succès diminue avec l'âge	16
1) Aspects quantitatifs.....	16
1.1 - Réserve ovarienne	16
1.2 - Physiologie	17
2) Aspects qualitatifs.....	18
2.1 - Aspects génétiques de l'ovocyte	18
2.1.1 - L'ovogenèse et les compétences ovocytaires	18
2.1.2 - Anomalies chromosomiques.....	20
2.1.3 - Le don d'ovocytes	22
2.2 - Aspects endométriaux.....	23
2.2.1 - Physiologie de l'implantation et immunité	23
2.2.2 - Biopsies de l'endomètre et réceptivité.....	24
II - La culture embryonnaire prolongée.....	25
A) Objectifs du couple versus objectifs du centre	25
B) Physiologie - cinétique de développement embryonnaire	26
1) Rappel cinétique physiologique du blastocyste	26
1.1- Développement embryonnaire	26
1.2 - Activation génomique.....	29
1.3- Time lapse.....	30
C) Décision précoce du devenir embryonnaire.....	31
1) Principe général.....	31
2) Classification BLEFCO.....	31
3) Limites	31
D) Décision tardive du devenir du blastocyste.....	32
1) Classification de Gardner	32
2) Avantages	32
3) Inconvénients	33
4) Facteurs influençant la culture prolongée.....	34

E) Problématique.....	37
Matériels et méthodes.....	38
I - Conditions de l'étude.....	39
II- Conditions de fécondation <i>in vitro</i> au laboratoire	40
A) Conditions de culture.....	40
1) La fécondation	40
2) La culture.....	41
B) Évaluation de l'aspect morphologique des embryons	42
1) Classification BLEFCO des embryons obtenus à J2.....	42
2) Classification des blastocystes obtenus à J5 ou à J6	43
C) Stratégie de transfert embryonnaire du centre	45
D) Mesure des résultats	46
1) Biologie.....	46
2) Clinique	46
E) Statistiques	46
Résultats.....	47
I - Âge de la femme et devenir biologique en culture prolongée.....	48
A) Taux global de blastocyste.....	48
B) Influence du nombre d'ovocytes recueillis à la ponction.....	52
C) Influence de l'aspect morphologique des embryons mis en culture prolongée à j2	53
D) Cinétique des blastocystes obtenus	54
E) Morphologie des blastocystes obtenus	55
1) Stades d'expansion.....	55
5.1 - Stade d'expansion à J5.....	55
5.2 - Stade d'expansion à J6.....	56
2) Morphologie détaillée à J5	57
F) Devenir des blastocystes obtenus: Notion de blastocyste utile	58
II – Âge de la femme et devenir clinique après culture prolongée.....	60
A) Taux de transfert.....	60
1) Taux global de transfert	60
2) Taux de transfert en fonction du nombre d'ovocytes recueillis à la ponction.....	61
3) Taux de transfert en fonction de l'aspect morphologique des embryons mis en culture prolongée à J2.....	62
B) Taux d'implantation	64
C) Taux de grossesse clinique par ponction	65
D) Taux de fausse couche clinique par grossesse clinique.....	66
E) Taux de naissance par ponction	67
F) Taux de grossesse multiple par naissance	68
G) Taux de naissance par transfert d'un blastocyste selon sa morphologie	69
1) Morphologie du blastocyste et taux de naissance quel que soit l'âge de la femme	69
2) Taux de naissance pour chaque type de morphologie en fonction de l'âge	70
Discussion.....	71
I – Âge de la femme et devenir biologique en culture prolongée	73
A) Taux global de blastocyste.....	73
B) Influence du nombre d'ovocytes recueillis à la ponction ovarienne	76
C) Influence de l'aspect morphologique des embryons mis en culture prolongée a J2	77
D) Cinétique des blastocystes obtenus	78
E) Morphologie des blastocystes obtenus	79

1) Stade d'expansion	79
2) Organisation des cellules.....	80
F) Devenir des blastocystes obtenus: notion de blastocyste utile	81
II – Âge de la femme et devenir clinique après culture prolongée.....	82
A) Taux de transfert.....	82
1) Taux de transfert global.....	82
2) Taux de transfert en fonction nombre d'ovocytes (J0)	82
3) Taux de transfert en fonction du nombre de TQE (J3).....	83
4) Stratégie de transfert/ taux de grossesse clinique	83
B) Taux d'implantation	84
C) Taux de grossesse clinique par ponction	85
D) Taux de fausse couche clinique par grossesse clinique.....	86
E) Taux de naissance par ponction	87
F) Taux de grossesse multiple par naissance	88
G) Taux de naissance par transfert d'un blastocyste selon sa morphologie	89
Conclusion et perspectives	90
Annexes	92
Bibliographie	118

LISTE DES FIGURES

Figure 1:.....	6
Âge moyen de la mère à l'accouchement	
Figure 2:.....	6
Naissances selon l'âge de la mère	
Figure 3:.....	8
Évolution de la proportion d'enfants conçus par AMP en France	
Figure 4:.....	9
Évolution de la fécondité naturelle en fonction de l'âge de la femme	
Figure 5:.....	10
Taux de grossesse clinique et de taux de naissance vivante en fonction de l'âge de la femme dans le service de Médecine et Biologie De la Reproduction du CHU de Tours	
Figure 6:.....	16
Évolution du pool folliculaire et correspondance avec les événements reproductifs	
Figure 7:.....	17
La folliculogénèse	
Figure 8:.....	19
L'ovogenèse	
Figure 9:.....	20
Taux d'embryons aneuploïdes en fonction de l'âge de la femme	
Figure 10:.....	23
Les étapes de l'implantation	
Figure 11:.....	26
Morphologie du blastocyste	
Figure 12:.....	27
Évolution cinétique du stade zygote au stade blastocyste en éclosion	
Figure 13:.....	28
Segmentation et migration de l'embryon dans la trompe et éclosion de l'embryon dans la cavité utérine	
Figure 14:.....	29
Activation génomique de l'embryon	
Figure 15:.....	42
Embryon de type 411	
Figure 16:.....	44
Caractéristiques morphologiques des blastocystes selon les critères établis par Gardner et Schoolcraft (Gardner et al, 1998)	
Figure 17:.....	48
Taux de blastocyste en fonction de l'âge de la femme	
Figure 18:.....	49
Taux de blastocyste en fonction des tranches d'âge de la femme	
Figure 19:.....	50
Flow-chart de la population étudiée	
Figure 20:.....	54
Proportion de blastocystes obtenus à J5 ou J6 en fonction de l'âge de la femme	
Figure 21:.....	55
Stade d'expansion des blastocystes obtenus à J5 en fonction de l'âge de la femme	
Figure 22:.....	56
Stade d'expansion des blastocystes obtenus à J6 en fonction de l'âge de la femme	

<i>Figure 23:</i>	57
<i>Morphologie des blastocystes J5 en fonction de l'âge de la femme</i>	
<i>Figure 24:</i>	58
<i>Proportion de blastocystes "utiles" ou "inutiles" en fonction de l'âge de la femme</i>	
<i>Figure 25:</i>	59
<i>Proportion de blastocystes transférés ou congelés parmi les blastocystes « utiles »</i>	
<i>Figure 26:</i>	60
<i>Taux global de transfert de blastocyste en fonction de l'âge de la femme</i>	
<i>Figure 27:</i>	64
<i>Taux d'implantation selon les tranches d'âges de la femme</i>	
<i>Figure 28:</i>	65
<i>Taux de grossesse par ponction selon les tranches d'âges de la femme</i>	
<i>Figure 29:</i>	66
<i>Taux de FCC par grossesse clinique selon les tranches d'âges de la femme</i>	
<i>Figure 30:</i>	67
<i>Taux de naissance par ponction selon les tranches d'âges de la femme</i>	
<i>Figure 31:</i>	68
<i>Taux de grossesse multiple parmi les naissances, selon les tranches d'âges de la femme</i>	
<i>Figure 32:</i>	69
<i>Taux de naissance par ponction en fonction de l'aspect morphologique du blastocyste</i>	
<i>Figure 33:</i>	70
<i>Taux de naissance par transfert d'un blastocyste selon sa morphologie en fonction de tranches d'âges</i>	
<i>Figure 34:</i>	74
<i>Pourcentage d'aneuploïdie en fonction de l'âge de la femme</i>	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: _____	8
<i>Évolution de l'âge des femmes en vue d'une Fécondation In Vitro de 2014 à 2017</i>	
Tableau II: _____	45
<i>Classification de la morphologie des blastocystes</i>	
Tableau III: _____	51
<i>Caractéristiques générales de la population étudiée</i>	
Tableau IV: _____	52
<i>Influence de l'âge de la femme sur le taux global de blastocyste en fonction du nombre d'ovocytes recueillis à la ponction</i>	
Tableau V: _____	53
<i>Influence de l'âge de la femme sur le taux de blastocyste en fonction du nombre d'embryons de top qualité mis en CP à J2</i>	
Tableau VI: _____	55
<i>Stade d'expansion des blastocystes obtenus à J5 en fonction de l'âge de la femme</i>	
Tableau VII: _____	56
<i>Stade d'expansion des blastocystes obtenus à J6 en fonction de l'âge de la femme</i>	
Tableau VIII: _____	61
<i>Influence de l'âge de la femme sur le taux de transfert en fonction du nombre d'ovocytes recueillis à la ponction</i>	
Tableau IX: _____	62
<i>Influence de l'âge de la femme sur le taux de transfert en fonction du nombre d'embryons de top qualité observé à J2</i>	
Tableau X: _____	63
<i>Influence de l'âge sur le taux d'embryon 411 en fonction du nombre d'ovocytes recueillis à la ponction</i>	
Tableau XI: _____	65
<i>Nombre moyen de blastocyste transféré en fonction de l'âge</i>	

ABRÉVIATIONS

ABM: Agence de la BioMédecine
AMA: Âge Maternel Avancé
AMH: Hormone Anti-Müllérienne
AMP: Assistance Médicale à la Procréation
CCS: Comprehensive Chromosomal Screening
CFA: Compte des Follicules Antraux
CP: Culture Prolongée
FCC: Fausse Couche Clinique
FIV: Fécondation *In Vitro*
ICSI: IntraCytoplasmic Sperm Injection
INED: Institut National d'Etudes Démographiques
INSEE: Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
LH: Hormone Lutéinisante
MBDR: Médecine et Biologie De la Reproduction
OR: Odds Ratio
PGS: Pre-implantation Genetic Screening
RO: Réserve Ovarienne
SS: Sécurité Sociale
TQE : Embryon de « Top Qualité »
ZP: Zone Pellucide

INTRODUCTION

I- L'ÂGE

A) DÉSIR RETARDÉ DE GROSSESSE

1) *ÉPIDÉMIOLOGIE GÉNÉRALE*

Selon un rapport de l'INSEE (*Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques*), paru en janvier 2020, l'âge moyen de la mère à l'accouchement connaît une hausse, passant de 28,8 ans en 1994 à 30,7 en 2019 (+1,9 ans en 25 ans) (**cf Figure 1**). Au fil des années, une inversion des tendances est observée (**cf Figure 2**). En effet, entre 1995 et 2018, le nombre de naissances pour 100 femmes a diminué chez les femmes entre 15 et 29 ans. Par contre, ce nombre a augmenté chez les femmes âgées de 30 ans et plus. En prenant pour exemple le groupe de femmes [30-34 ans], il est passé de 10 naissances pour 100 femmes en 1995 à 12,7 en 2018 (+2,7 naissances pour 100 femmes en 23 ans). De plus, on note que dans le groupe d'âge [40-50 ans], les naissances ont plus que doublé en 23 ans (passant de 0,4% à 0,9%).

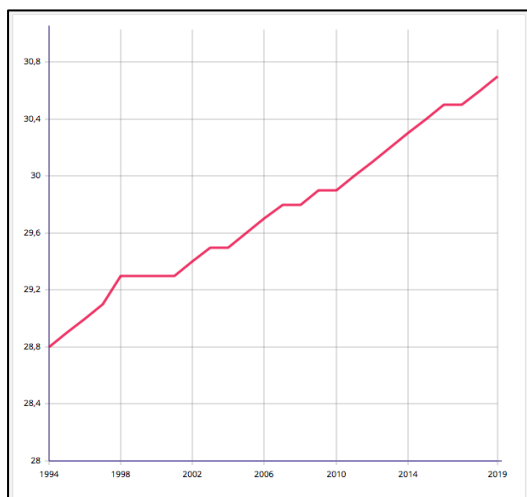


Figure 1:

Âge moyen de la mère à l'accouchement

Source: INSEE, Estimations de population et statistiques de l'état civil, 2020

	Nombre de naissances pour 100 femmes					Âge moyen des mères
	15-24 ans	25-29 ans	30-34 ans	35-39 ans	40-50 ans	
1995	3,3	13,2	10,0	4,0	0,4	28,9
2000	3,3	13,4	11,7	5,0	0,5	29,3
2005	3,2	12,8	12,3	5,7	0,6	29,6
2017 (p)	2,4	11,2	12,8	6,9	0,9	30,5
2018 (p)	2,3	11,0	12,7	7,0	0,9	30,6

Figure 2:

Naissances selon l'âge de la mère

Source: INSEE, Estimations de population et statistiques de l'état civil, 2020

2) *RAISONS DE CES MATERNITÉS TARDIVES*

La légalisation de la contraception en France en 1967 (Loi Neuwirth), a été le signe d'une véritable révolution pour les femmes. Selon une enquête de santé publique France publiée en 2016 concernant la contraception, plus de sept femmes sur dix (71,8 %) recourent à une méthode médicalisée pour assurer leur contraception (pilule, dispositif intra utérin, implant, patch, anneau, injection, stérilisation tubaire, vasectomie du conjoint) (Rahib et al, 2016).

Ce phénomène de grossesse tardive, qui a commencé il y a quelques années peut s'expliquer par une **évolution de notre société** conduisant à un recul de l'âge du premier enfant touchant aussi bien les femmes fertiles qu'infertiles (Belaisch-Allart, 2004).

Le Professeur Michel Tournaire, dans un ouvrage, évoque plusieurs raisons pouvant expliquer ce phénomène (Tournaire, 2005);

- › Les **études**, qui sont actuellement de plus en plus longues et l'envie pour les femmes d'avoir une carrière professionnelle. La concrétisation d'un projet de grossesse ne vient alors qu'au second plan.
- › La **psychologie**: en prenant de l'âge, les femmes se sentent davantage prête à devenir mère et le projet est alors murement réfléchi avec le conjoint.
- › Toutefois, pour certains couples, ce **désir** n'est pas toujours partagé au même moment. Le désir d'enfant peut être présent plus ou moins tôt chez les partenaires. L'homme serait souvent moins pressé. Il « aurait le temps » alors que la femme sait que le temps ne joue pas en sa faveur.
- › La **stabilité affective** tardive, les secondes unions sont une autre forme d'explication.
- › Et parfois c'est l'**infertilité** qui aboutit à une grossesse tardive.

Au fil des années la notion de désir d'enfant a pris son importance: la maternité n'est plus au centre de l'identité féminine et doit être un **choix personnel**.

3) ÂGE MATERNEL ET ASSISTANCE MÉDICALE A LA PROCRÉATION

En France, l'évolution de la proportion d'enfants conçus par Assistance Médicale à la Procréation (AMP) ne cesse d'augmenter (**cf Figure 3**).

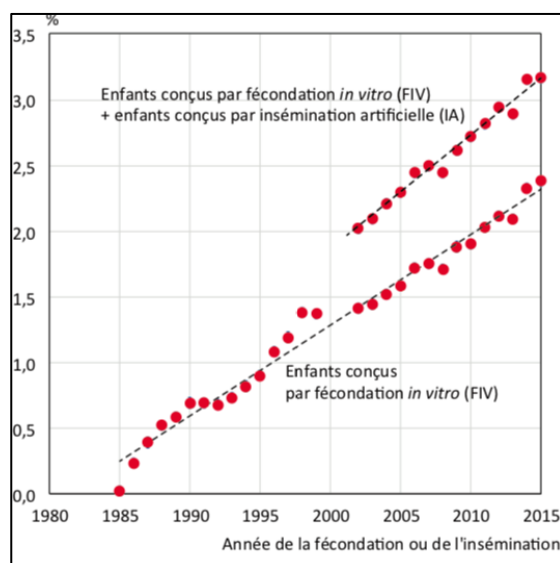


Figure 3:

Évolution de la proportion d'enfants conçus par AMP en France

Source: Elise de la Rochebrochard, Population & Sociétés n°556, INED, juin 2018

Les femmes bénéficiant d'une AMP ont une moyenne d'âge comprise entre 32-34 ans en France selon l'Agence de Biomédecine (Rapport ABM 2018). Comme le montre le tableau ci-dessous, en 4 ans, la demande d'AMP a diminué chez les femmes âgées de 34 ans et moins, et *a contrario*, a augmenté entre 35 et 42 ans (**cf Tableau I**).

Tableau I:

Évolution de l'âge des femmes en vue d'une Fécondation In Vitro de 2014 à 2017

	2014	2015	2016	2017	
<30 ans	22,5%	22%	21,1%	20,6%	-1,9%
30-34 ans	35,1%	34,8%	34,7%	34,2%	-0,9%
35-37 ans	18,7%	19,3%	19,9%	20,6%	+1,9%
38-39 ans	9,8%	9,9%	10,5%	10,7%	+0,9%
40-42 ans	12,1%	12,5%	12,2%	12,2%	+0,1%
43 ans et +	1,7%	1,6%	1,6%	1,7%	=

Source: Agence de la biomédecine, Rapport médical et scientifique, 2018

Dans le service de Médecine et Biologie De la Reproduction (MBDR) du CHRU de Tours cette moyenne était de 32,6 ans en 2011 puis est passé à 33,4 ans en 2019.

4) CONSÉQUENCES DE CES DÉSIRS TARDIFS

Cette évolution n'est pas sans poser de problèmes. En effet, devenir maman à un âge plus avancé interroge; notamment sur les chances de grossesse en prenant en compte la **diminution du taux de fécondité** puis les **complications obstétricales** (materno-fœtales). La question d'âge seuil se pose aussi; *à partir de quel âge parle-t-on d'une femme « âgée » en terme reproductif?*

4.1 - Fertilité, chance de grossesse et âge de la femme

En ce qui concerne la procréation, l'âge de la femme est un des facteurs critiques, pour déterminer la probabilité de conception, soit naturellement, soit à la suite d'une Fécondation *In Vitro* (FIV) (Tarin et al, 2014). En effet, à propos de la grossesse tardive, il est important de considérer **l'échelle de temps biologique**, relayée par la médecine, relative à la physiologie des femmes (et des hommes) qui fixe les potentialités et les limites de la procréation.

Chez la femme, l'horloge biologique est une réalité. La femme dispose d'un stock définitif d'ovocytes à la naissance et les capacités reproductives de celle-ci vont diminuer avec l'âge à partir de 35 ans et ce drastiquement après 40 ans (**cf Figure 4**).

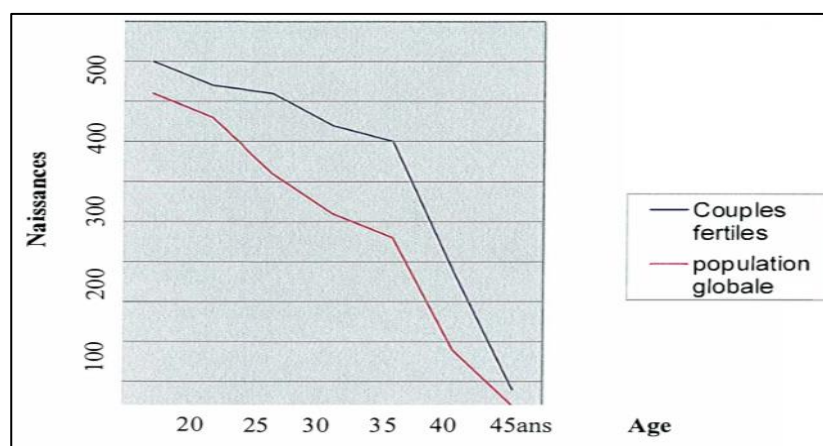


Figure 4:

Évolution de la fécondité naturelle en fonction de l'âge de la femme

Source : *La lettre du gynécologue*, n°246, 1999

Si l'âge moyen de la ménopause est aux alentours de 50 ans, on sait que la réserve ovarienne diminue bien plus précocement (Nikolaou et al, 2013). La probabilité d'avoir un enfant vivant par cycle naturel est de 24% à 25 ans pour chuter à 12% à 35 ans et 5% à 40 ans (Larsen et al, 2000). Le pourcentage de grossesses non menées à termes (fausses couches) va également s'accroître avec l'âge (Khoshnood et al, 2008).

Dans notre centre, cette chute brutale de la fertilité est aussi observée chez les femmes en démarche d'AMP (cf **Figure 5**).

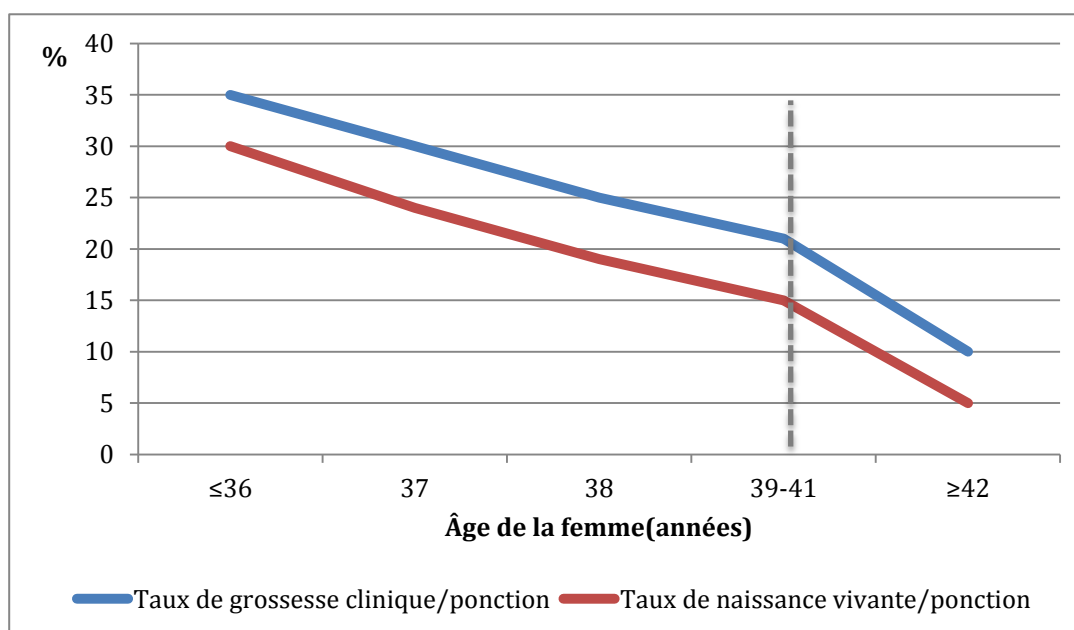


Figure 5:

Taux de grossesse clinique et de taux de naissance vivante en fonction de l'âge de la femme dans le service de Médecine et Biologie De la Reproduction du CHU de Tours

Source: données du CHU de Tours 2008-2017

4.2 - Complications obstétricales et âge de la femme

La finalité de la prise en charge d'un couple infertile en FIV est d'aboutir à une naissance vivante sans complication pour la mère et l'enfant. Toutefois, au-delà de 40 ans, les complications liées à la grossesse sont en effet plus fréquentes (Pinheiro et al, 2019). C'est à partir de cet âge que les spécialistes parlent de **grossesse tardive**. Et dans leur esprit, ce qualificatif est bien souvent synonyme de risque.

Pendant la grossesse

- *Fausses couches cliniques (FCC) et grossesses extra-utérines (GEU)*

Elles sont plus fréquentes lorsque l'âge de la femme augmente. D'après des données hospitalières nationales des États-Unis, les FCC et les GEU augmentent d'environ 45% chez les femmes de 35 à 44 ans en comparaison avec celles de 20 à 34 ans (Benett et al, 1998; Bacak et al, 2005). Une étude Danoise a trouvé que le risque global de FCC était plus élevé chez les femmes de 35 ans et plus (Anderson et al, 2000). D'après cette étude, 54% des grossesses après 42 ans se soldent par des fausses couches, alors que le risque global est de 8% à 22 ans. Toujours selon cette étude, plus d'une grossesse sur cinq à partir de 35 ans et plus d'une grossesse sur deux à partir de 40 ans, se termine par une FCC.

- *Diabète gestationnel, hypertension gravidique et pré-éclampsie*

Dans une étude comparant 9 556 grossesses uniques chez des femmes de 35 ans et plus avec celles de 20 à 29 ans, il a été mis en évidence qu'il y avait 4,5 fois plus de diabète gestationnel et 3 fois plus de pré-éclampsie chez les femmes les plus âgées (Bobrowski et al, 1995). Chez les femmes de 40 ans, l'hypertension gravidique est 3 à 12 fois plus fréquente par rapport aux femmes de 20-34 ans (Roman et al, 2004).

- *Risque de grossesse multiple*

En France, selon l'INED (Institut National d'Etudes Démographiques), 12 146 femmes ont accouché de jumeaux en 2018 et le taux d'accouchement gémellaire était de 17 pour 1000 (INED, 2019). Ce rapport ne précise pas la proportion entre grossesse naturelle et grossesse post-AMP. Toutefois, on peut noter que ce taux est le résultat d'une augmentation régulière des accouchements multiples depuis le milieu des années 70 (8,9 pour 1000 en 1972).

Trois facteurs principaux ont contribué à cette augmentation :

- › **Les traitements pour pallier à l'infertilité:** s'ils permettent à des femmes hypofertiles de concevoir, ces traitements augmentent aussi sensiblement le risque de grossesse multiple (Fauser et al, 2005).
- › **L'AMP:** notamment avec le transfert de plusieurs embryons donnant des grossesses multiples dizygotes. Cependant, il n'est pas rare d'observer en FIV, suite à un transfert d'un seul embryon, une grossesse gémellaire monozygote (Derom et al, 2005).
- › La fréquence des accouchements multiples croît avec **l'âge de la femme** parallèlement à l'élévation importante de FSH, induisant des ovulations multiples. En 1972 (avant le développement des traitements de l'infertilité), le taux d'accouchements gémellaires était minimum chez les femmes de moins de 20 ans (5,8 pour 1000) et maximum chez les femmes de 35-39 ans (13,0 pour 1000), soit un risque multiplié par 2,2 entre ces deux classes d'âges (Bomsel-Helmreich et al, 2005).

En 2017, en ce qui concerne les techniques de FIV (classique et ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection)), environ une grossesse sur 10 (11,5%) donne lieu à une grossesse gémellaire contre près d'une sur 80 lorsque la grossesse a été obtenue de façon naturelle (Agence de la biomédecine, Le rapport médical et scientifique de 2018).

Dans le cas des grossesses gémellaires, l'Âge Maternel Avancé (AMA) entraîne un risque nettement plus élevé d'hémorragie du post-partum, de diabète gestationnel et d'accouchement prématuré par rapport aux femmes plus jeunes (Zhu et al, 2019). Les femmes ayant une grossesse gémellaire, âgées de plus de 35 ans, ont un taux significativement plus élevé de césariennes et de troubles hypertensifs. Ce taux augmente avec l'âge de la mère, sans augmentation du taux de complications néonatales (Gluck et al, 2018).

A l'accouchement

- *Césarienne*

On observe un taux plus élevé de césarienne à partir de 40 ans, surtout s'il s'agit d'une première naissance. Cette augmentation s'explique par une moins bonne contractilité de l'utérus, un taux plus élevé de présentation en siège et de grossesse multiple (Meyer et al, 2007). Le risque de césarienne, pour une grossesse unique, indépendamment de la parité, augmente avec l'âge (Richards et al, 2016).

- *Mortalité maternelle*

La mortalité maternelle est stable en France depuis une dizaine d'années mais le risque de décès reste inéluctablement lié à l'âge (Meyer et al, 2007). En 2010, selon l'Institut National de Veille Sanitaire, le risque de mortalité maternelle par rapport aux femmes de 20 à 24 ans était: 3 fois plus élevé à 35-39 ans, 8 fois plus élevé à 40-44 ans, 30 fois plus élevé au-delà de 45 ans (Institut National de Veille Sanitaire, 2010). Le risque de mortalité maternelle, pour une grossesse unique, augmente avec l'âge (Oliveira et al, 2014).

En post-partum

Le risque thromboembolique est augmenté de 38 % chez les femmes de plus de 35 ans par rapport à des femmes plus jeunes (James et al, 2006).

En conclusion, le vieillissement des femmes s'accompagne d'une **baisse de la fécondité** (Khoshnood et al, 2008), d'une **diminution de la fonction ovarienne** (Lie Fong et al, 2012), d'une **détérioration de la qualité des ovocytes** (Miao et al, 2009) et d'une **augmentation du taux d'aneuploïdie des embryons** (Franasiak et al, 2014), ce qui entraîne une **augmentation du taux de fausse couche** (Wilcox et al, 2019), une **diminution du taux de grossesse** (Tomazevic et al, 2007) et du **taux de naissance vivante** (Tomazevic et al, 2007).

4.3 - Complications pour l'enfant

- *Mort fœtale in utero*

Une étude concernant les grossesses uniques montre que le risque de mort fœtale in utero augmenterait à partir de 30 ans (Waldenström et al, 2013).

- *Risque de prématurité et de faible poids de naissance*

Plusieurs études confirment l'augmentation du risque de prématurité et de petit poids à la naissance en lien avec un AMA pour une grossesse unique (Delpisheh et al, 2008 ; Kenny et al, 2013 ; Blomberg et al, 2014). Une étude réalisée à partir de 160 000 naissances uniques au Canada, a montré que le taux d'accouchement prématuré était relativement stable entre 25 et 34 ans (5,1%), et passait à 6,2% pour les femmes de 35 à 39 ans et 7,2% pour les femmes de 40 ans et plus (Joseph et al, de 2005). Dans une étude traitant des accouchements prématurés, il est retrouvé un Odds Ratio (OR) de 1,25 après 40 ans par rapport aux femmes plus jeunes (Shrim et al, 2010).

- *Risque d'anomalies chromosomiques*

Depuis longtemps, le lien entre la prévalence des enfants porteurs d'anomalies chromosomiques (particulièrement les trisomies autosomiques) et l'âge de la femme est établi (Leck et al, 1994). Dans une étude récente, pratiquant le PGS (Preimplantation Genetic Screening), il est observé que le coefficient de corrélation entre l'âge de la femme et les anomalies chromosomiques est positif, ce qui signifie que plus la femme est « âgée », plus l'embryon a de risques de présenter des anomalies chromosomiques. Quand l'âge de la femme augmente d'une unité, l'incidence du nombre de chromosomes augmente de 0,01 unité (Dang et al, 2019).

La prévalence de l'aneuploïdie augmente de façon constante de 31 ans à 43 ans puis ensuite, atteint un plateau. Les chromosomes les plus affectés par l'âge sont les chromosomes 7, 8 et 14 (Dang et al, 2019). Chez les femmes AMA, les anomalies chromosomiques présentes chez l'enfant sont, le plus souvent des cas de trisomies (Franasiak et al, 2014).

- *Les malformations congénitales*

L'OR pour les malformations cardiaques est de 3,95 chez les nourrissons de femmes de 40 ans ou plus par rapport aux femmes de 20 à 24 ans (Hollier et al, 2000). Les risques de pied bot et de hernie diaphragmatique augmentent également avec l'âge de la mère.

Le syndrome de Down est une des anomalies congénitales les plus fréquentes chez les femmes « âgées » et constitue la toute première cause génétique connue de retard mental (Roizen et al, 2003).

D'autres anomalies chromosomiques moins fréquentes, dont le syndrome d'Edwards (trisomie 18) et le syndrome de Klinefelter (génotype 47,XXY) semblent aussi augmenter de manière exponentielle avec l'âge (Hook et al, 1981).

4.4 - Âge seuil

4.1.1 – Réglementation

L'âge limite pour concevoir est une notion hétérogène avec une variabilité selon les études. Il n'y a pas de règle générale commune dans les pays européens. Pour certains, un âge maximum pour concevoir est défini précisément (Grèce - 50 ans, Belgique - 45 ans, Luxembourg - 43 ans), alors que pour l'Autriche, l'Italie, le Royaume-Uni, aucune limite n'est mentionnée. D'autres pays, dont la France, le Portugal et le Royaume-Uni, ont défini l'âge d'accès à l'AMP comme « l'âge naturel de la procréation » sans plus de précision (Agence de la Biomédecine, 2017).

Il est à noter qu'en France, la commission nationale de MBDR avait proposé en juillet 2004 que « *pour des raisons associant l'efficacité des techniques d'AMP et l'intérêt de l'enfant, il est recommandé de ne pas accéder à une demande d'AMP lorsque l'âge de la femme est supérieur à 42 ans révolus et/ou l'âge de l'homme est supérieur à 59 ans révolus* » (Agence de la Biomédecine, 2017).

Suite à ces recommandations et pour des considérations essentiellement médicales (mauvais résultats de l'AMP pour des femmes présentant un AMA avec un rapport bénéfice/risque négatif), il a été décidé le 11 mars 2005 par l'Union Nationale des Caisses d'Assurance Maladie d'interrompre au jour du 43^{ème} anniversaire de la femme, la prise en charge en FIV.

4.1.2 – Stratégie de transfert

La viabilité embryonnaire est évaluée par analyse de la morphologie des embryons, d'abord précocement après 2/3 jours de culture, puis tardivement après 5/6 jours de culture.

Suite à l'observation précoce des embryons et en fonction du dossier clinique du couple, le biologiste et son équipe prennent une décision: **transférer un ou plusieurs embryons à J2 ou mise en CP de toute la cohorte embryonnaire.**

La notion de transfert prend alors toute son importance. En effet, seul un transfert embryonnaire valide une tentative de FIV selon la Sécurité Sociale (SS).

Si la stratégie est de transférer au stade blastocyste (J5/J6) et que les embryons obtenus à J2/J3 ne se développent pas jusqu'à ce stade, il n'y aura pas de transfert possible. Dans ce cas, la tentative ne sera pas comptabilisée par la SS. Cela laissera au couple l'opportunité de réitérer une nouvelle tentative (après discussion du corps médical). Par contre si le transfert des embryons a lieu à J3, cela est compté comme une tentative par la SS.

Il est donc important, lors de la prise de décision sur le devenir des embryons à J2, de garder à l'esprit que **seul le geste du transfert est comptabilisé par la SS.**

C'est cela qui amène à se poser les questions suivantes: quelle stratégie de transfert adopter pour les femmes avec un AMA? Réaliser un transfert précoce au risque de « perdre » une tentative? Ou mettre les embryons en CP au risque de ne pas obtenir de transfert?

B) LE SUCCÈS DIMINUE AVEC L'ÂGE

1) *ASPECTS QUANTITATIFS*

L'ovaire a une double fonction: une fonction de **gamétogenèse**, puisqu'il assure la croissance, la maturation puis l'émission du gamète femelle: l'ovocyte; et une fonction **endocrinienne** puisqu'il synthétise des hormones stéroïdiennes. C'est **à partir de la puberté et jusqu'à la ménopause** que l'ovaire assure complètement cette double fonction.

1.1 - Réserve ovarienne

La cellule germinale et les cellules folliculaires forment initialement les follicules ovariens primordiaux. Ils commencent à se former au cours du 4^{ème} mois de grossesse. Le pool maximal de follicules primordiaux est obtenu vers le 7^{ème} mois de gestation (Forabosco et al, 2007). Il constitue la **réserve ovarienne (RO) non renouvelable de la femme**.

Ce pool folliculaire ne cessera par la suite de diminuer de façon progressive. A la naissance on l'estime à 1 million; il serait d'environ 400 000 à la puberté, de 25 000 à 37 ans, de 10 000 à 40 ans et moins de 1000 à la ménopause (Hansen et al, 2008) (cf **Figure 6**).

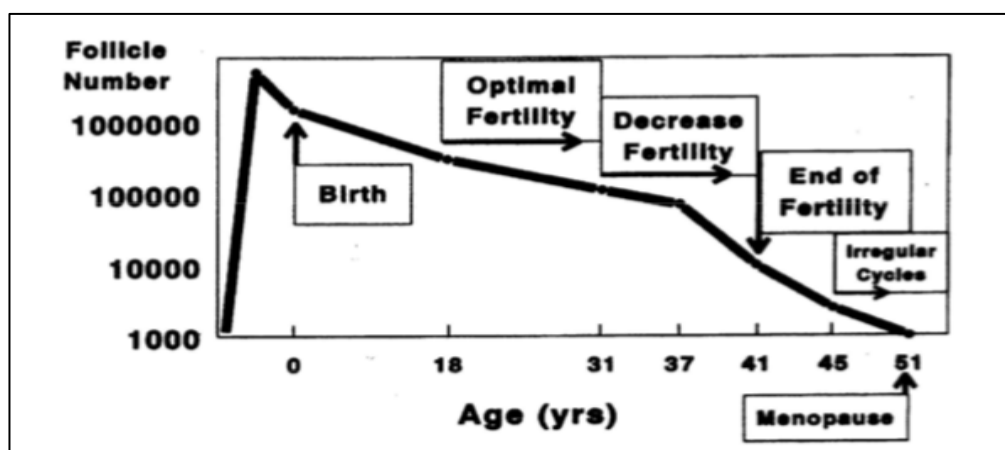


Figure 6:

Évolution du pool folliculaire et correspondance avec les événements reproductifs

Source: Te Velde, Molecular&Cellular Endocrinology, 1998, 145

Plusieurs marqueurs biologiques et échographiques ont été étudiés pour objectiver le niveau de la RO (Ferté-Delbande et al, 2010). L'**Hormone Anti-Müllérienne (AMH)** semble être un bon marqueur pour repérer une diminution de la RO (De Vet et al, 2002) alors que le **Compte des Follicules Antraux (CFA)** semble bien corrélé au nombre de follicules primordiaux et donc à la RO restante (Scheffer et al, 1999).

1.2 - Physiologie

La folliculogénèse est un ensemble de processus au cours duquel un follicule primordial se développe pour atteindre l'ovulation (moins de 0,1%) ou s'atrophie par apoptose (99,9%) (William et al, 2000). Ainsi on distingue les follicules primordiaux qui constituent le pool de réserve et les follicules entrés en folliculogénèse. Parmi eux on compte, les follicules primaires, secondaires, antraux, de De Graaf et atrophiques (**cf Figure 7**).

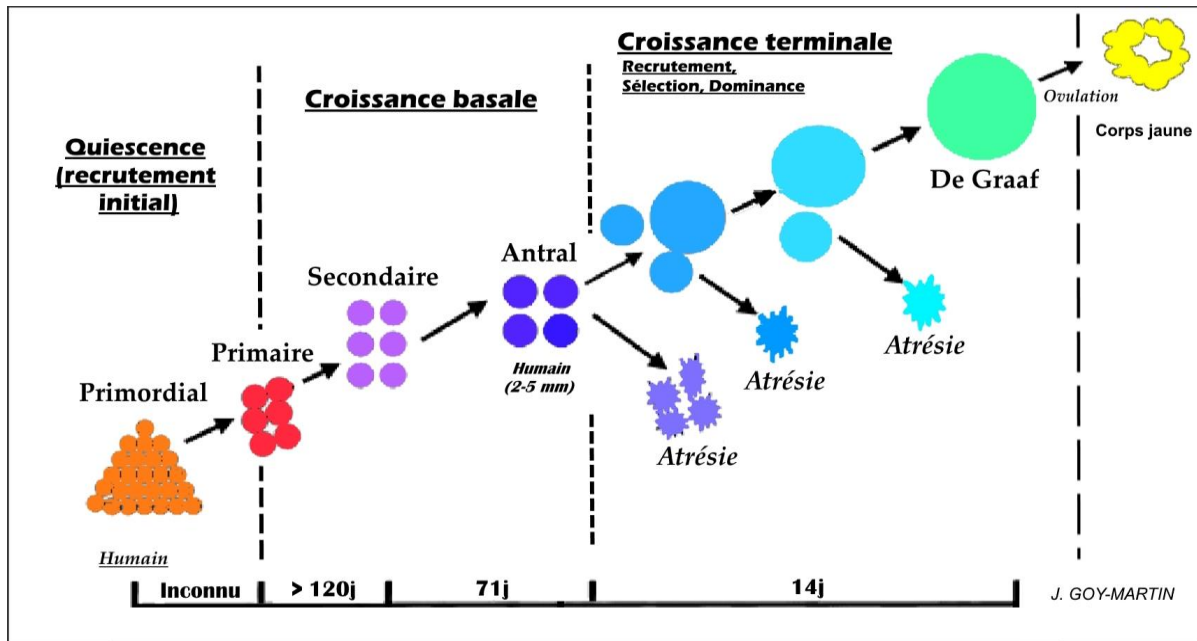


Figure 7:

La folliculogénèse

Source: Cours sur la folliculogénèse - J.Goy-Martin

Le déclin de la fonction reproductive de la femme est directement lié à son âge en raison d'une réduction du pool des follicules primordiaux et de la qualité ovocytaire (Haadsma et al, 2007).

2) ASPECTS QUALITATIFS

2.1 - Aspects génétiques de l'ovocyte

2.1.1 - L'ovogenèse et les compétences ovocytaires

La maturation est l'étape finale d'un long processus de différenciation au cours duquel l'ovocyte acquiert sa capacité à assumer la fécondation et à supporter le développement embryonnaire (Mermillod et al, 2014).

Entre l'ovocyte recueilli et le nouveau-né, il y a un certain nombre d'étapes nécessitant d'une part, la **compétence nucléaire** (reprise de la méiose), mais aussi la **compétence cytoplasmique** (développement de l'ovocyte fécondé jusqu'au stade de nouveau-né vivant).

L'acquisition de la compétence ovocytaire est un processus complexe empruntant un grand nombre de voies qui sont, soit difficiles à évaluer, soit difficiles à contrôler. Le développement jusqu'au stade blastocyste est un repère minimal pour parler de compétence au développement. L'implantation viable reste le paramètre de référence (Royere et al, 2006).

La finalité de l'ovogenèse est d'obtenir un **ovocyte en métaphase II, mature et fécondable** (cf **Figure 8**). C'est un phénomène discontinu constitué de 3 phases:

- *Multiplication*

C'est la division des ovogonies par mitoses du 4^{ème} au 7^{ème} mois de la **vie fœtale** permettant la **constitution du pool de cellules germinales**. L'ovogonie se différencie en ovocyte I. Ce dernier entre en méiose pour connaître un 1^{er} blocage en fin de prophase I.

- *Croissance*

Elle a lieu au cours de la **vie post-natale**. Elle permet la synthèse de protéines spécifiques (des protéines du cycle cellulaire, des glycoprotéines de la ZP permettant l'augmentation de l'épaisseur de la ZP, concomitante avec l'augmentation du diamètre de l'ovocyte), des modifications cytoplasmiques (activation des mitochondries et de l'appareil de Golgi: formation des granules corticaux), une transcription intense (accumulation d'ARN). C'est à ce moment que l'ovocyte acquiert des **compétences méiotiques** (capacité à reprendre la méiose) et des **compétences au développement** (maturation cytoplasmique).

- *Maturation ovocytaire*

Elle se produit au cours de la **puberté**. C'est la conséquence de la décharge ovulante de LH (Hormone Lutéinisante). C'est alors l'étape finale de cette longue évolution. Elle comprend la suite de la maturation nucléaire (reprise de la méiose avec l'expulsion du premier globule polaire et nouveau blocage en métaphase II), de la maturation cytoplasmique (migration des granules corticaux sous la membrane plasmique, facteur de décondensation de la tête du spermatozoïde) et de la maturation membranaire. S'il y a fécondation, il y aura reprise de la méiose, aboutissant à l'expulsion du 2^{ème} globule polaire.

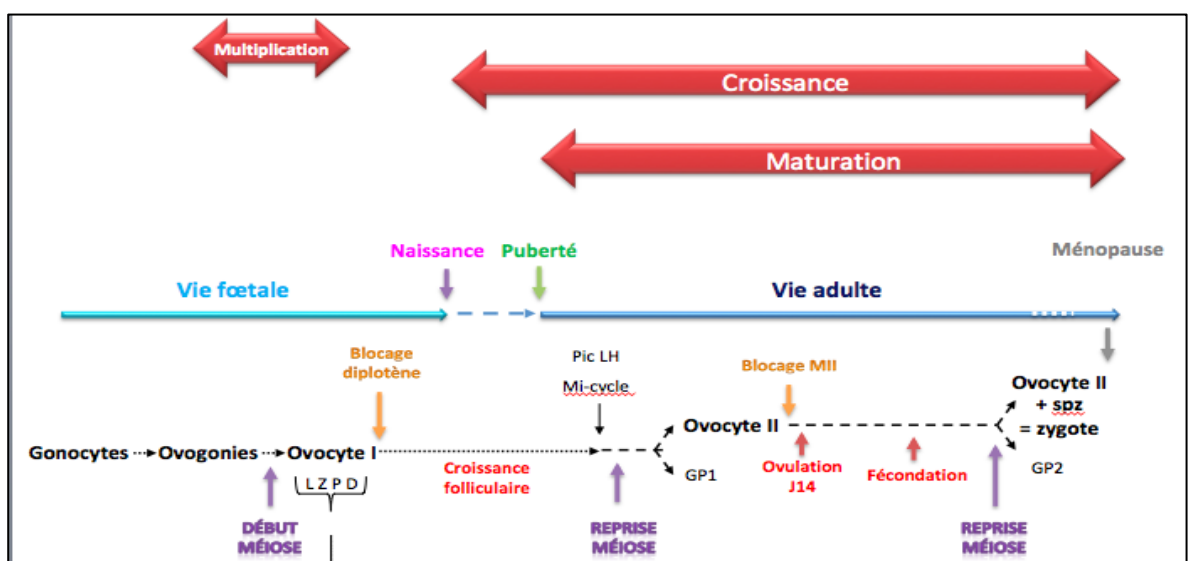


Figure 8:

L'ovogenèse

Source: Cours Ovogenèse de Pr May-Panloup du CHU d'Angers

2.1.2 - Anomalies chromosomiques

Lors de la reprise de la méiose, il peut y avoir des anomalies des « checkpoints » ce qui conduit à des anomalies chromosomiques (Pellestor et al, 2004).

L'aneuploïdie, à savoir un nombre anormal de chromosomes, est un phénomène connu et fréquent chez les embryons d'origine humaine, cette aneuploïdie est responsable de plus de la moitié des cas de fausse couche spontanée (Franasiak et al, 2014).

Les taux d'aneuploïdies embryonnaires observées se majorent avec l'âge de la femme induisant un accroissement du risque d'avortements précoces (40% à 40 ans, > 50% à 42 ans et 75% après 45 ans) (Anderson et al, 2000). Cependant, une proportion importante des embryons issus de femmes jeunes en FIV (dont les donneuses d'ovocytes), présente également des aneuploïdies (Baart et al, 2006). Dans l'étude rétrospective de Franasiak et al, avec biopsie de blastocyste et analyse par Comprehensive Chromosomal Screening (CCS, c'est-à-dire analyse simultanée des 23 paires de chromosomes), le plus faible taux d'aneuploïdies est observé entre 26 et 30 ans, puis il augmente régulièrement avec l'âge jusqu'à atteindre 85% après 43 ans (**cf Figure 9**).

Enfin, l'évaluation du ratio trisomie/monosomie entre les âges a montré une augmentation des monosomies chez les jeunes femmes et une augmentation des trisomies chez les femmes plus âgées (Franasiak et al, 2014). Les patientes âgées de moins de 26 ans et de plus de 34 ans ont une probabilité progressivement plus élevée d'obtenir des embryons présentant des anomalies chromosomiques.

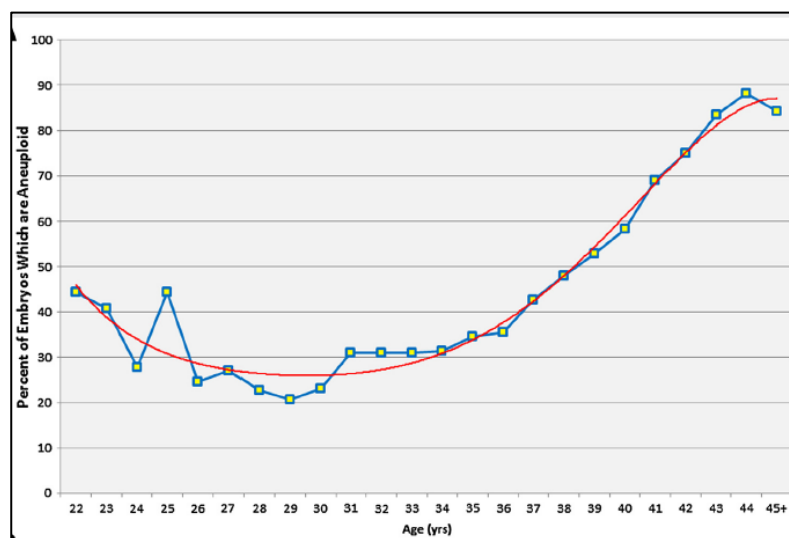


Figure 9:

Taux d'embryons aneuploïdes en fonction de l'âge de la femme

Source: Franasiak et al, 2014

- *Quels moyens a-t-on à ce jour d'évaluer le caractère euploïde d'un embryon ?*

En France, les « meilleurs embryons » sont choisis en fonction de **critères morphologiques statiques ou morpho-cinétiques**. Cependant, même au meilleur grade de classification, il existe des défauts d'implantation ou des risques de fausse couche spontanée (Capalbo et al, 2014). Selon cette étude, seulement 56% des Embryons de « Top Qualité » (TQE) sont euploïdes, traduisant ainsi une discordance majeure entre l'aspect morphologique observé au microscope et l'état chromosomique de l'embryon.

- *L'étude génétique préimplantatoire de l'embryon (PGS)*

Le PGS est une pratique autorisée dans certains centres étrangers mais interdite en France actuellement selon la loi de Bioéthique. Ce screening génétique est réalisé par biopsie de cellules du trophoctoderme, lorsque l'embryon est au stade de blastocyste (Scott et al, 2013). En effet à ce jour, la biopsie de cellules du trophoctoderme au 5^e ou 6^e jour de développement du blastocyste, permet une étude plus complète des chromosomes embryonnaires (De Vos et al, 2009). *A priori*, cette technique ne paraît pas délétère pour l'embryon (Scott et al, 2013), néanmoins elle reste un procédé invasif. La cohorte de blastocystes obtenus à J5, au préalable biopsés, est alors vitrifiée. Les embryons euploïdes seront ensuite décongelés et transférés. On peut alors parler de freeze-all.

Le transfert d'embryons euploïdes a été proposé pour accroître les taux d'implantation et de naissance vivante, et réduire le taux de fausse couche précoce (Mastenbroock et al, 2017). D'après certaines études, le PGS permettrait d'améliorer le taux de grossesse (Forman et al, 2013 ; Chen et al, 2015). Selon ces études, le taux de grossesse évolutive est amélioré de près de 30% après PGS lorsqu'un embryon reconnu comme euploïde est transféré au stade blastocyste. En revanche, cette observation est assez controversée, certains auteurs affirment que le PGS n'améliore pas les résultats de la FIV (Ubaldi et al, 2015 ; Kang et al, 2016).

Toutefois, il est important d'insister auprès du couple sur le fait que cette technique ne modifie pas les chances de naissance vivante par ponction ovocytaire mais peut permettre de réduire le nombre de transferts nécessaires à l'obtention d'une grossesse.

En effet,

- › Avec l'utilisation du PGS, nous pouvons parler de stratégie « **sooner** » ; la grossesse est obtenue plus rapidement grâce au PGS qui aura permis de sélectionner les embryons euploïdes, présentant un meilleur taux d'implantation que les embryons aneuploïdes (Sullivan et al, 2018).
- › Sans l'utilisation du PGS, la stratégie est dite « **later** » ; la sélection des embryons est faite sur des critères uniquement morphologiques, les embryons euploïdes, sont non identifiés et donc ils sont, soit transférés lors du premier transfert, soit congelés et transférés par la suite. La grossesse sera donc obtenue, mais de manière plus tardive (Mastenbroek et al, 2011).

Néanmoins les indications restent controversées. Le PGS pourrait, dans certaines situations (AMA (> 35 ans), échecs d'implantation répétés, fausses couches à répétition) augmenter les taux de succès par transfert et diminuer les échecs d'implantation et les avortements spontanés (Rubio et al, 2017 ; Shahine et al, 2016). Même après transfert d'un

embryon euploïde, des échecs d'implantation sont évidemment possibles pour différentes raisons: délétions ou duplications de novo, altération de la réceptivité endométriale (Benard et al, 2019).

Si le PGS est un outil supplémentaire dans le domaine de l'AMP, son rapport coût-efficacité reste discuté, et il n'existe actuellement pas de preuve justifiant son utilisation systématique lors des FIV. Son développement est source de débats éthiques. C'est une des raisons pour laquelle la pratique du PGS n'est, à ce jour, pas autorisée en France.

2.1.3 - Le don d'ovocytes

Le don d'ovocytes représente une autre alternative, en plus de l'utilisation du PGS, pour pallier à l'effet de l'âge. En effet, si avec la diminution de la fonction ovarienne chez les femmes avec un AMA, le nombre de follicules diminue (Grondahl et al, 2010), le taux d'aneuploïdies ovocytaires augmente (Vialard et al, 2007), il a été aussi décrit que la **réceptivité de l'endomètre** était affecté (Soares et al, 2005), avec évidemment une incidence sur l'issue de la grossesse.

Dans le cas des femmes présentant un AMA, le recours au don d'ovocytes permet de palier au déficit de la fonction ovarienne, autrement dit, à une insuffisance ovarienne liée à l'âge. Cela permet de s'affranchir de l'âge des ovocytes puisque ceux-ci proviennent de femmes plus jeunes.

En France, le don d'ovocytes est régi par la loi de bioéthique du 29 juillet 1994, révisée en juillet 2011 (la condition pour la donneuse d'avoir eu au moins un enfant a été supprimée). Le texte précise que la donneuse, anonyme et volontaire, agit à titre gratuit. Elle doit être majeure, âgée de moins de 37 ans et en bonne santé. Si elle vit en couple, son conjoint doit également consentir au don. Le recours au don d'ovocytes est autorisé jusqu'à 43 ans maximum. Dans notre centre, pour bénéficier d'un don d'ovocytes il faut avoir moins de 38 ans.

Aujourd'hui, le don d'ovocytes est un modèle puissant pour l'étude du rôle du déclin des qualités ovocytaires et utérines lié à l'âge, car les embryons issus d'« ovocytes jeunes » peuvent être transférés dans des utérus de femmes AMA.

L'utérus conserve sa réceptivité à l'implantation embryonnaire pendant une longue période après la diminution de la réserve des cellules ovariennes, tant qu'un soutien hormonal endogène ou exogène adéquat existe ou est fourni (Sauer et al, 1993). Le taux d'implantation des embryons provenant de dons d'ovocytes n'est pratiquement pas affecté par l'âge des receveuses (Simchen et al, 2009).

2.2 - Aspects endométriaux

2.2.1 - Physiologie de l'implantation et immunité

L'être humain présente une grande proportion de fausses couches ou d'avortements spontanés ainsi que de grossesses biochimiques. Il a été montré que 2/3 de ces événements sont dus à une implantation incomplète de l'embryon (Semprini et al, 2000 ; Norwitz et al, 2000).

En effet, dans l'espèce humaine, l'établissement de la grossesse physiologique requiert un **endomètre utérin réceptif**, un **blastocyste compétent** ainsi qu'un dialogue (dialogue materno-fœtale) complexe et synchronisé, à l'interface materno-embryonnaire, induisant la **tolérance immunitaire** à l'allogreffe fœtale et le remodelage vasculaire primordial pour la formation du placenta. L'embryon est toujours génétiquement partiellement différent de sa mère du fait de l'expression des gènes paternels. Il existe donc des mécanismes de tolérance immunitaire au moment de l'implantation embryonnaire pour non seulement empêcher son rejet mais au contraire stimuler sa nutrition et sa croissance. Cette réaction immunitaire a lieu spécifiquement dans l'endomètre au moment de la **fenêtre implantatoire** qui se situe 5 à 9 jours après l'ovulation (Strowitzki et al, 2006). Durant cette période apparaît dans l'endomètre des cellules immunitaires spécifiques dont l'expression sera fondamentale pour permettre l'implantation embryonnaire et la construction du placenta (Ledee-Bataille, 2005 ; Chaouat et al, 2010).

L'implantation embryonnaire humaine est un phénomène complexe, qui se déroule en 3 étapes: **l'apposition, l'adhésion et l'invasion**, nécessitant sur le versant endométrial une réaction inflammatoire transitoire (phénomène actif), suivie de l'établissement d'un environnement cytokinique tolérogène (cytokines, facteurs de croissance, chimiokines, récepteurs et molécules d'adhésion) produits et sécrétés par l'endomètre et par l'embryon (Thouas et al, 2014) (**cf Figure 10**).

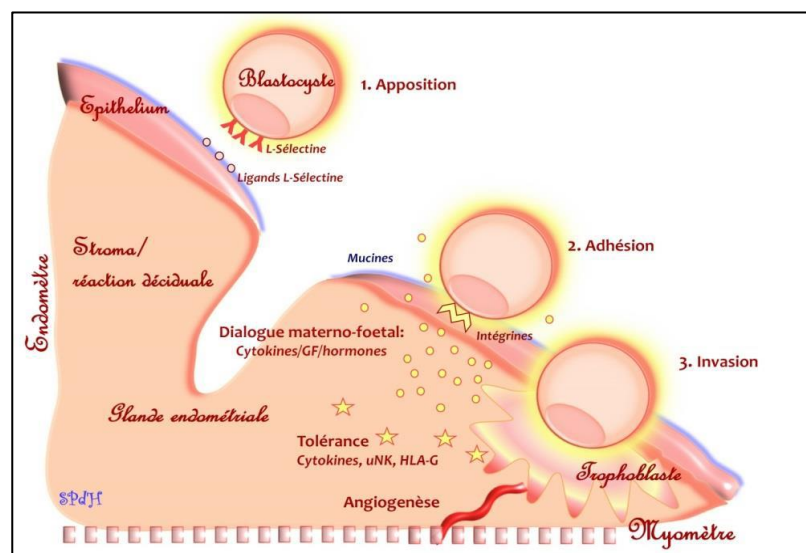


Figure 10:

Les étapes de l'implantation

Source: Figure extraite du Cours de Biologie de la Reproduction 2009-2010, Pr S. Perrier d'Hauterive

Deux mécanismes peuvent aboutir à l'absence d'implantation ou à une FCC:

- › Sous-activation immunitaire: La réaction immunitaire ne se fait pas. Les cellules immunitaires (cytokines angiogéniques TH-2, cellules uNK) ne sont pas présentes ou sont immatures. L'endomètre reste antiadhésif et l'embryon transféré ne parvient pas à adhérer à l'endomètre.
- › Sur-activation immunitaire: Les cellules immunitaires sont bien présentes mais elles sont hyper-activées et deviennent tueuses. Il n'y a pas d'immuno-régulation locale. Elles reconnaissent l'embryon comme étranger. Il est alors rejeté.

2.2.2 - Biopsies de l'endomètre et réceptivité

La biopsie de l'endomètre permet de vérifier la présence et l'activité de cellules immunitaires nécessaires à la future implantation de l'embryon. En effet, un défaut ou, au contraire, une activité immunitaire locale excessive peut aboutir à l'échec de l'implantation embryonnaire. Cet examen, en analysant le système immunitaire local au sein de l'endomètre, permet de définir une prise en charge précise et personnalisée de l'infertilité afin de rétablir l'équilibre endométrial et favoriser ainsi l'implantation de l'embryon. Le bilan de la réceptivité utérine doit impérativement être réalisé en phase de fenêtre implantatoire.

Cette exploration est plus particulièrement destinée:

- › Aux femmes présentant des échecs d'implantation répétés et inexpliqués après plusieurs tentatives de FIV.
- › Aux femmes ayant fait plusieurs FCC.
- › Aux femmes envisageant le recours au don d'ovocytes et désireuses de s'assurer au préalable d'une réceptivité utérine adéquate.
- › Aux femmes présentant une infertilité inexpliquée.

En fonction du déséquilibre identifié, des suggestions de personnalisation de soin sont proposées pour rééquilibrer l'environnement et favoriser l'implantation.

L'état immunitaire utérin est susceptible de varier au cours de la vie et peut être influencé par de nombreux facteurs. Le présent profil immunitaire utérin est donc valide pour les 9 mois à venir.

Nous venons de décrire la technique MatriceLab® consistant à l'identification de marqueurs immunologiques spécifiques à l'endomètre à partir d'une biopsie d'endomètre.

Il existe aussi le test ERA (Endometrial Receptivity Array), réalisé également par biopsie de l'endomètre puis analyse de l'expression de 238 gènes (Mahajan et al, 2015). Quand les cellules entrent dans la phase de réceptivité optimale, les gènes s'activent ou se désactivent selon un code qui peut être déchiffré.

II – LA CULTURE EMBRYONNAIRE PROLONGÉE

A) OBJECTIFS DU COUPLE VERSUS OBJECTIFS DU CENTRE

L'objectif ultime de la FIV est d'offrir à des couples infertiles la naissance d'un bébé en bonne santé.

L'objectif du couple, demandeur d'AMP est le même, indépendamment de tous les problèmes qu'ils ont pu rencontrer. Leur but est d'agrandir leur famille, en ramenant chez eux un enfant en pleine forme et le plus rapidement possible. Il n'est pas rare que ces couples sollicitent le centre en exprimant un désir de grossesse multiple pour « rattraper le temps perdu » et limiter les contraintes liées aux venues répétées dans le centre.

Toutefois, même si l'objectif reste le même pour le centre d'AMP: **un succès rapide avec la naissance d'un enfant en bonne santé et une grossesse normale pour la femme**, le centre se doit de concilier plusieurs paramètres. Cela passe par un objectif principal; obtenir un bon taux de naissance tout en ayant le taux de grossesse multiple le plus bas possible afin d'éviter les risques évoqués précédemment. Notamment, et cela peut être cause de désaccord avec le couple, le centre a pour objectif de diminuer le nombre d'embryons transférés.

Pour atteindre ces objectifs, il faut optimiser le traitement hormonal, afin de recruter un nombre raisonnable de follicules, puis d'obtenir des ovocytes de bonne qualité. Cela aidera, le laboratoire de FIV, à obtenir des embryons de « bonne qualité » destinés au transfert ou à la congélation.

B) PHYSIOLOGIE - CINÉTIQUE DE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

1) *RAPPEL CINÉTIQUE PHYSIOLOGIQUE DU BLASTOCYTE*

1.1- Développement embryonnaire

Les embryons se divisent au rythme d'environ une division toutes les 10 heures. Lorsque l'embryon atteint le stade 16 cellules, il est habituellement appelé morula (petite mûre).

A 64 cellules, une cavité liquidienne se forme au sein de l'embryon qui est alors appelé **blastocyste**. A ce stade, l'embryon est constitué de 2 types de cellules (**cf Figure 11**):

- les cellules de la périphérie ou **cellules du trophectoderme** sont à l'origine des annexes de l'embryon (placenta)
- les cellules de la **masse cellulaire interne** donneront l'embryon lui-même

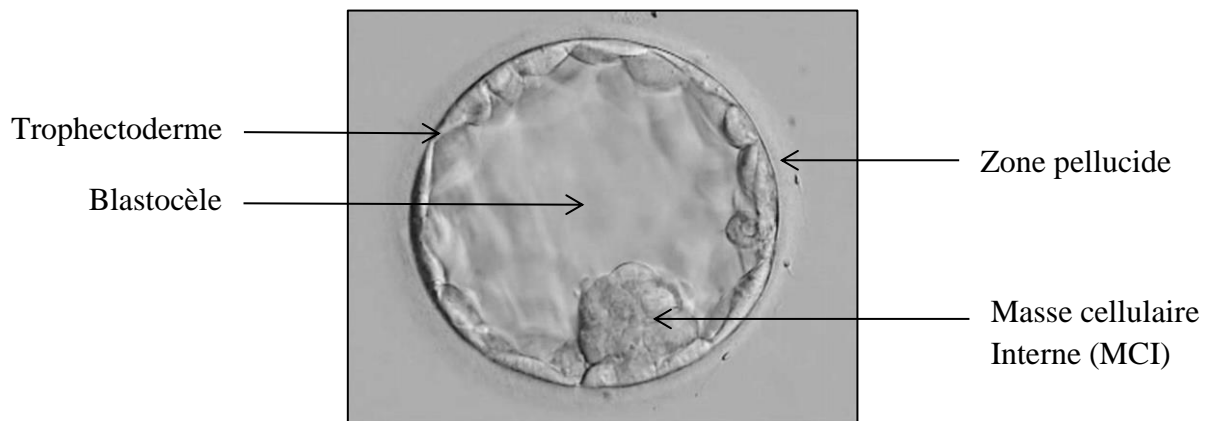


Figure 11:
Morphologie du blastocyste

Avant expansion du blastocyste, celui-ci est toujours entouré par sa Zone Pellucide (ZP). De plus sa taille n'a pas évolué, c'est celle des blastomères qui a diminué.

Lors de l'expansion, le blastocyste va augmenter de taille suite à une entrée d'eau. Puis il se libère de sa zone pellucide: c'est l'éclosion du blastocyste. Ce hatching a lieu au 5 ou 6^{ème} jour après la fécondation (**cf Figure 12**).

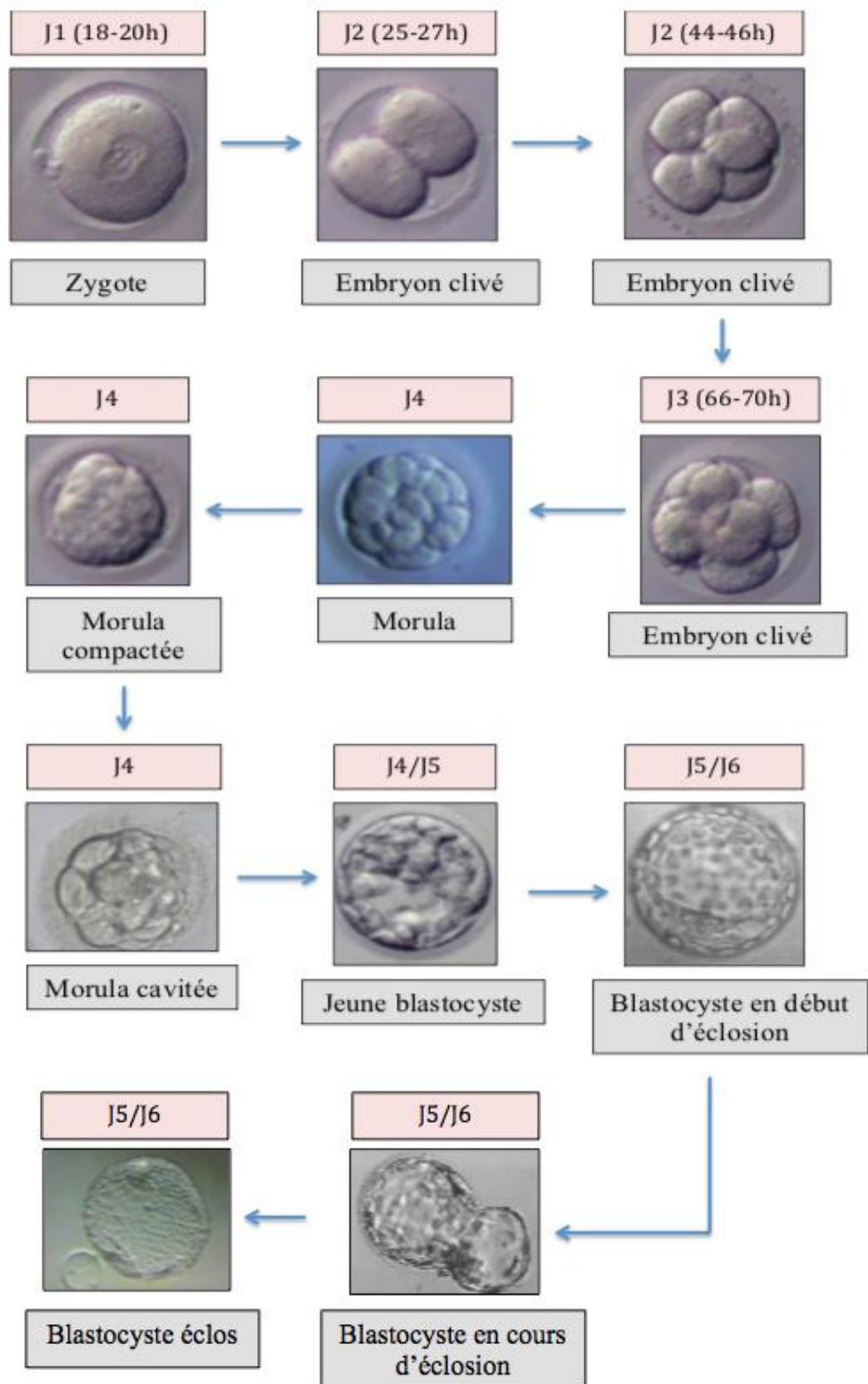


Figure 12:
Évolution cinétique du stade zygote au stade du blastocyste en éclosion

Pendant son développement, l'embryon va migrer depuis le 1/3 externe de la trompe où a eu lieu la fécondation, pour se diriger vers l'utérus où il s'implantera. Ce déplacement est facilité par les contractions de la paroi musculaire de la trompe et par les cils présents sur la paroi de la trompe. Grâce à leurs mouvements, ces cils vont pousser l'embryon vers l'utérus. L'embryon arrivera donc dans l'utérus vers le 4^{ème} jour après la fécondation (**cf Figure 13**).

Au cours de cette migration dans la trompe, l'embryon réalise le processus de segmentation et reste entouré de la zone pellucide jusqu'à son arrivée dans la cavité utérine.

Après son éclosion (hatching) dans l'utérus, le blastocyste se fixera sur l'endomètre puis pénétrera celui-ci avant de s'implanter à l'intérieur de la muqueuse: c'est la **nidation**.

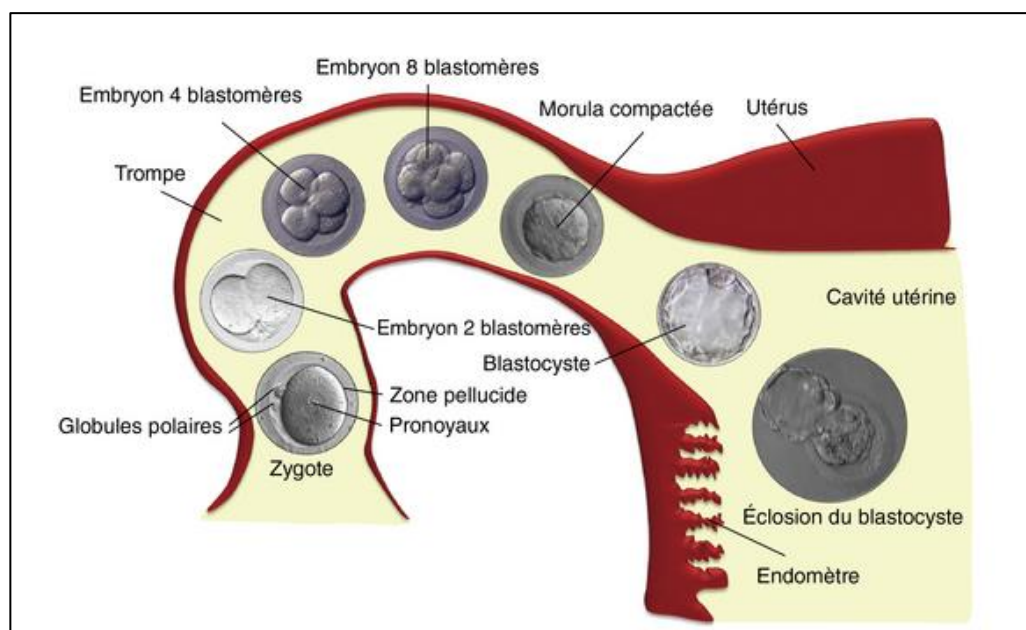


Figure 13:

Segmentation et migration de l'embryon dans la trompe et éclosion de l'embryon dans la cavité utérine

Source : <https://clemedicine.com/30-developpement-embryonnaire-humain/>

1.2 - Activation génomique

Dans l'espèce humaine, le **génomme embryonnaire** n'est pas encore actif au stade zygote. L'activité du nouveau génome embryonnaire constitué à partir des deux génomes parentaux ne débute qu'à partir du stade 4 à 8 blastomères. L'activation génomique de l'embryon va entraîner le début de la **transcription embryonnaire** (cf **Figure 14**). C'est une étape cruciale pour permettre à l'embryon humain de poursuivre son développement (Braude et al, 1988).

Il existe des différences de fonctionnement entre certaines régions des chromosomes paternels et maternels au cours du développement embryonnaire correspondant au processus de **l'empreinte parentale**. La majorité des gènes s'exprime de façon bi-allélique, mais certains gènes vont s'exprimer physiologiquement de façon mono-allélique en fonction de l'origine maternelle ou paternelle des allèles. Ainsi, pour un gène soumis à l'empreinte parentale, l'allèle d'origine maternelle sera exprimé dans les cellules et l'allèle d'origine paternelle sera inactivé, ou inversement. Ces différences d'expression des allèles de certains gènes soumis à l'empreinte parentale indiquent que les génomes maternel et paternel sont tous deux complémentaires et indispensables au développement complet et normal de l'embryon.

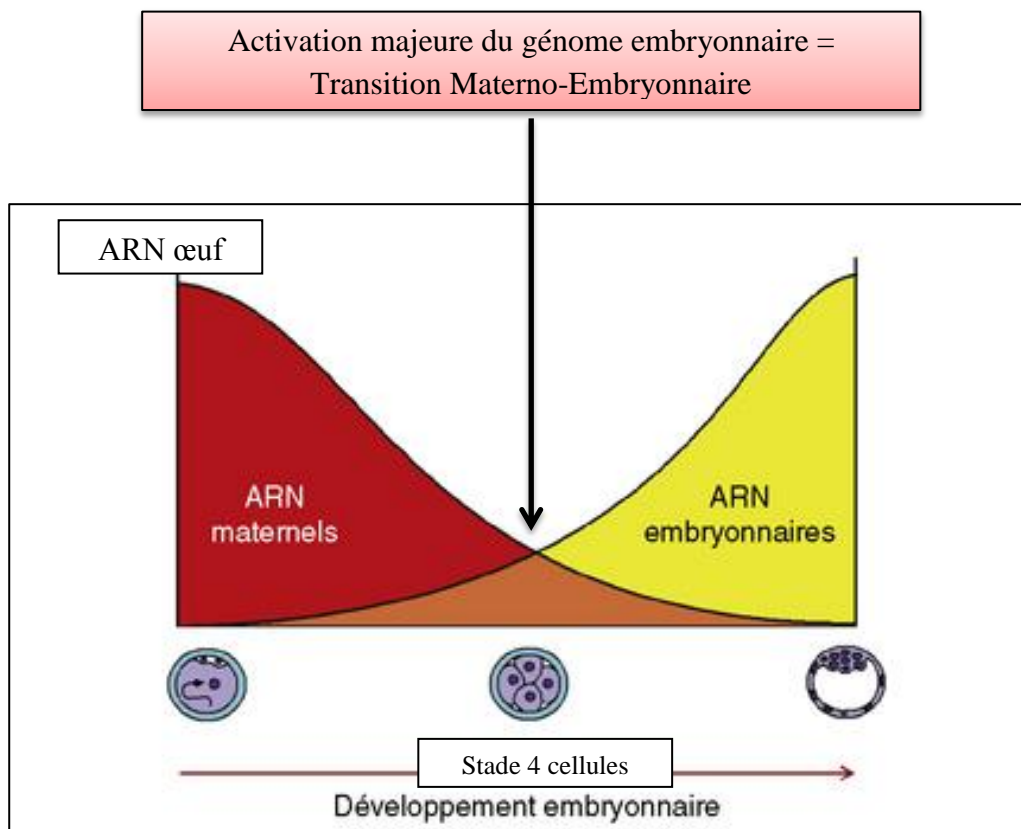


Figure 14:

Activation génomique de l'embryon

Source: <https://clemedicine.com/30-developpement-embryonnaire-humain/>

1.3- Time lapse

L'évaluation morphologique classique repose sur l'étude statique de la morphologie embryonnaire de façon quotidienne. La fréquence d'observation des embryons est en effet limitée par la rupture de l'homéostasie des conditions de culture embryonnaire. Cependant il a été montré que la morphologie embryonnaire et donc son évaluation pouvaient varier considérablement en quelques heures (Mio et al, 2008).

Le time lapse, ou monitoring vidéo du développement embryonnaire permet de remplacer l'évaluation morphologique ponctuelle par un **suivi continu du développement embryonnaire** (prise régulière de photos de l'embryon tout au long de son développement) sans altérer les conditions environnementales (température, humidité, pH, taux d'oxygène...), c'est-à-dire sans modification des conditions de culture.

Cela permet de diminuer le nombre de perturbations induites par les ouvertures de porte des incubateurs et les examens microscopiques. En outre l'évaluation constante de la morphologie des embryons (time lapse) permet de s'intéresser à l'aspect cinétique de l'évolution des embryons. Le time lapse présente d'autres avantages, notamment celui de gagner en objectivité et en reproductibilité de l'évaluation de la qualité embryonnaire (diminution de la variabilité inter-intra opérateur par rapport à l'analyse morphologique conventionnelle) (Sundvall et al, 2013).

Les embryons qui se développent jusqu'au stade de blastocyste ont une cinétique différente de ceux qui arrêtent leur développement. Même si il n'y a pas de réponse claire à ce jour dans la littérature, la cinétique semble plus sensible que la morphologie conventionnelle, mais pas encore suffisamment spécifique pour être utilisée comme seule variable de choix de la stratégie de transfert embryonnaire.

C) DÉCISION PRÉCOCE DU DEVENIR EMBRYONNAIRE

L'approche la plus commune pour évaluer la qualité des embryons est la description morphologique des embryons à J2/J3.

1) *PRINCIPE GÉNÉRAL*

Actuellement, la seule technique de sélection embryonnaire universellement reconnue est l'évaluation de la **morphologie embryonnaire précoce**. Les différents aspects de cette évaluation ont fait l'objet d'un consensus européen en 2011 (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology). Ce consensus donne des recommandations sur l'heure de lecture des embryons après insémination ou injection et propose une classification de la morphologie embryonnaire du zygote au blastocyste, permettant d'uniformiser les pratiques entre les différents laboratoires.

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

2) *CLASSIFICATION BLEFCO*

Cf section Matériels et Méthodes.

3) *LIMITES*

L'observation précoce de l'embryon présente certaines limites:

- › C'est une **méthode subjective** qui souffre d'une grande variabilité intra- et inter-opérateurs (Baxter Bendus et al, 2006).
- › La **corrélation entre paramètres morphologiques et taux d'implantation reste insuffisante** (Scott et al, 2000). En effet, dans la littérature internationale, il est largement reconnu que la pertinence des critères de sélection (basés sur la morphologie conventionnelle) des embryons J2 ou J3 est limitée (Sjöblom et al, 2006) avec une décevante valeur prédictive en terme de succès d'implantation (Guérif et al, 2007).
- › 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.
- › Les critères morphologiques ne sont pas applicables à toutes les patientes. En effet, il existe une **perte de corrélation quand l'âge de la femme augmente** (Stensen et al, 2010).

D) DÉCISION TARDIVE DU DEVENIR DU BLASTOCYTE

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.

La culture prolongée (CP) en aidant à identifier les embryons pour lesquels l'activation génomique a été effectuée, permet alors une **sélection embryonnaire plus précise** afin de transférer le blastocyste dont la qualité est la plus optimale.

L'objectif principal est donc de transférer/congeler un seul ou des blastocystes (Guérif et al, 2009) avec le meilleur potentiel implantatoire (Sifer et al, 2016) parmi les embryons disponibles de la cohorte. Les blastocystes obtenus seront évalués selon différentes classifications morphologiques dont celle du Dr D. Gardner (Gardner DK et al, 1998) ou celle définie par des experts européens (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Ces classifications intègrent le stade d'expansion du blastocyste ainsi que l'organisation cellulaire du trophoctoderme et de la masse cellulaire interne.

Cette technique permet une sélection des embryons en éliminant les embryons dont le développement se bloque précocement (en moyenne, 55% des embryons évoluent jusqu'au stade de blastocyste).

1) *CLASSIFICATION DE GARDNER*

Cf section Matériels et Méthodes.

2) *AVANTAGES*

La CP présente plusieurs intérêts théoriques et avérés qui peuvent justifier sa mise en œuvre.

- *Aboutir à un transfert embryonnaire dans un environnement physiologique*

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).

- *Identifier un embryon ayant franchi le cap de l'activation génomique*

Dans l'espèce humaine, **l'activation génomique de l'embryon** se situe aux alentours du 3^{ème} jour de développement. La culture embryonnaire prolongée permettrait donc d'écarter d'un potentiel transfert les embryons qui n'ont pas témoigné de cette activation (Connie et al, 2010). S'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), il a été mis en évidence qu'un développement au stade blastocyste ne garantissait pas une absence d'anomalie chromosomique (Harton et al, 2013).

- *Permettre le transfert d'embryons avec des capacités implantatoires améliorées*

Des études ont démontré que le transfert frais de **blastocystes augmenterait les taux d'implantation**. Par exemple les travaux du Dr D. Gardner en 1998 (45,5% d'implantation à J5 vs 21% d'implantation à J3) (Gardner et al, 1998), ou encore de Van der Auwera et al en 2002 (46% d'implantation à J5 vs 21% d'implantation à J3) (Van der Auwera et al, 2002), parmi tant d'autres.

La CP permet d'affiner la sélection embryonnaire au-delà de l'activation génomique, mais elle permet aussi de procéder à une **sélection morphologique** parmi tous les blastocystes obtenus dans la cohorte.

- *Favoriser le développement de la stratégie de transfert embryonnaire unique*

Comme nous avons pu le voir, les grossesses multiples sont associées à un risque accru de malformation pour les enfants et à des risques de morbi-mortalité foeto-maternel associés.

La CP, avec pour objectif le transfert d'un seul blastocyste, a toute sa place dans l'optique de réduire de manière importante le taux de grossesse multiple (Gardner et al, 2004). 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).

3) INCONVÉNIENTS

Malgré ces multiples avantages, la CP présente toutefois certaines limites.

- *L'observation des arrêts de développement embryonnaire*

La culture embryonnaire prolongée se traduit par un **arrêt de développement embryonnaire** dans des proportions variables selon l'aspect morphologique des embryons cultivés. En effet, il existe de nombreuses observations relevant que le nombre de cellules à J2/J3 et le taux de fragmentation sont directement corrélés au potentiel de développement au stade blastocyste (Neuber et al, 2013).

- *Diminution du taux de transfert*

La réticence principale à la pratique de la CP est de **ne pas obtenir de blastocystes**. Le taux d'annulation de transfert est inévitablement plus important que pour les transferts envisagés à un stade précoce. Plusieurs études sont concordantes à ce sujet, telle que celle de Van der Auwera rapportant un OR de 3,56 [1,31 ; 9,69] (Van der Auwera et al, 2002) ou celle de Kolibianakis publiant un OR a 2,56 (Kolibianakis et al, 2004). L'annulation d'un transfert à l'issue d'une CP peut se justifier auprès des couples comme évitant de susciter de faux espoirs de grossesse après transfert d'un embryon de potentiel implantatoire réduit (Papanikolaou et al, 2008).

- *L'absence de certitude d'une sélection d'embryons euploïdes*

Au stade de blastocyste, dans la plupart des cas, l'impact est peu visible et le fait d'aboutir à un blastocyste avec des caractéristiques morphologiques satisfaisantes n'apporte **aucune certitude sur la ploïdie** de l'embryon (Fragouli et al, 2014).

- *Augmentation du risque de grossesse gémellaire monozygote*

Des données suggèrent une **augmentation du risque de grossesse gémellaire monozygote** après transfert au stade de blastocyste avec un OR de 4,04 (Chang et al, 2009 ; Dessolle et al, 2010).

- *Complications materno-foetale*

Des études ont répertorié des **complications** suites à un transfert de blastocyste, notamment l'augmentation du risque de prématurité, l'augmentation du risque pour le nouveau-né d'avoir un petit poids de naissance (Dar et al, 2014). Deux méta-analyses ont confirmé que les grossesses obtenues par FIV après transfert au stade de blastocyste avaient un risque relatif plus élevé de prématurité (<37 SA) et de grande prématurité (<32 SA) comparé à celles obtenues par transfert d'embryons précoces (Dar et al, 2014 ; Maheshwari et al, 2013).

4) FACTEURS INFLUENÇANT LA CULTURE PROLONGÉE

- *Les conditions de culture*

Le principal rôle d'un laboratoire d'AMP 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).

Concernant les incubateurs; la température, le niveau de CO₂ et le niveau d'O₂ sont trois critères essentiels devant être maîtrisés et contrôlés. Il est important de disposer d'un nombre suffisant d'étuves afin de diminuer l'ouverture des portes et maintenir constantes les conditions de culture.

- *Activités du laboratoire*

- 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 obtenus (Catala et al, 2012).

- La qualité du sperme
Certaines études ont mis en évidence que le clivage embryonnaire, la qualité des embryons et le taux d'implantation étaient dépendants des paramètres spermatiques et donc que la sévérité des anomalies spermatiques pouvait être en cause en cas d'altération de ces paramètres (Palermo et al, 1999). 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.
- La température de manipulation
Maintenir une température optimale de 37°C lors de la manipulation des gamètes et des embryons assure un meilleur développement des embryons et évite les anomalies génétiques (Lane et al, 2008).
- La technique de fécondation
Actuellement, la FIV classique et l'ICSI sont les deux techniques d'AMP 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 FIV 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 a un impact sur le développement jusqu'au stade blastocyste et sur leur qualité. 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).

Et puis, il y a l'âge de la femme à prendre en compte, c'est un critère important à ne pas sous-estimer. En effet, en ce qui concerne la procréation, l'âge de la femme est un des facteurs les plus critiques. Il fera l'objet de notre étude.

En conclusion sur la CP, les données internationales sont assez consensuelles pour affirmer **la force du blastocyste** dans une stratégie de transfert mono-embryonnaire.

C'est pour cela, qu'actuellement, devant l'efficacité de la CP comme outil de sélection embryonnaire, elle est devenue une technique de routine, utilisée dans de nombreux laboratoires d'AMP.

Le service de Médecine et Biologie De la Reproduction du CHRU de Tours a pris le parti de développer la CP depuis plus de 20 ans pour améliorer les chances des couples à débiter une grossesse tout en réduisant les risques de grossesse multiple par la stratégie du transfert unique.

Comme nous avons pu le voir, si la fertilité naturelle diminue avec l'âge, l'AMP apparaît, pour certains couples dont l'âge de la femme est avancé, comme un « remède » incertain.

L'extension de la culture d'embryon jusqu'au stade de blastocyste peut-elle augmenter les chances de transfert d'embryons viables et génétiquement normaux? Peut-elle être un outil important pour une meilleure sélection des embryons à un AMA?

E) PROBLÉMATIQUE

Mon travail a consisté en l'évaluation de l'impact de l'âge de la femme sur l'obtention de blastocystes dans le service de Médecine et Biologie De la Reproduction du CHRU de Tours entre 2011 et 2019. Le but de cette étude étant de répondre à deux questions principales qui permettront, par la suite, d'optimiser au mieux la prise en charge des femmes avec un AMA:

- Quelle est l'efficacité de la CP chez les patientes avec un AMA?
- Faut-il envisager la CP à un âge maternel plus avancé?
- Existe-il un âge limite pour envisager la CP?

La littérature étant discordantes et les comparaisons difficiles sur ces points, nous allons essayer de trouver des réponses à ces interrogations avec l'analyse des données du centre.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I - CONDITIONS DE L'ÉTUDE

Cette étude a été menée rétrospectivement dans le service de MBDR du CHRU de Tours, de 2011 à 2019. Sur ces neuf années, nous avons collecté toutes les tentatives de FIV (FIV classique et ICSI) hors don d'ovocytes. Nous n'avons pas identifié de critères d'exclusion en ce qui concerne la qualité du sperme.

Cela a conduit à recueillir les données de 4 963 patientes, ce qui représente 24 520 embryons à J2 et 14 262 blastocystes obtenus à J5 et J6.

Dans notre étude, la moyenne d'âge des femmes est de $33,1 \pm 4,5$ ans.

Notre problématique concerne l'impact de l'âge de la femme sur la CP. Suite à l'analyse des données individuelles d'âges, nous avons pu regrouper certains âges féminins et ainsi travailler avec 4 tranches d'âge, répartis comme suit ; [20-22], [23-36], [37-40], [41-43] ans. Cela nous a permis aussi de prendre comme groupe de référence les femmes âgées de 23 à 36 ans.

Après avoir recueilli les données et déterminé les tranches d'âge de la femme à analyser, nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'impact de l'âge de la femme sur le devenir biologique en CP. Dans un second temps, nous avons étudié l'impact de l'âge de la femme sur le devenir clinique après CP.

II- CONDITIONS DE FÉCONDATION *IN VITRO* AU LABORATOIRE

A) CONDITIONS DE CULTURE

1) LA FÉCONDATION

La mise en fécondation s'effectue à J0.

La FIV classique consiste à mettre en contact, la cohorte ovocytaire et les spermatozoïdes mobiles progressifs sélectionnés lors de la préparation. Pour cela, des boîtes à puits sont utilisées. Chaque puits contient du milieu de culture. Les ovocytes recueillis seront déposés dans les puits (4 à 5 ovocytes dans chaque) puis seront ajoutés environ 75 000 spermatozoïdes mobiles progressifs sélectionnés par puits.

L'ICSI consiste en l'injection intra-cytoplasmique d'un spermatozoïde dans un ovocyte mature sur le plan nucléaire. Cette technique est précédée d'une étape de décoronisation enzymatique (à l'aide d'une enzyme: la hyaluronidase) et mécanique (mouvement d'aspiration-refoulement de l'ovocyte à l'aide d'un capillaire) permettant d'éliminer les cellules du cumulus de l'ovocyte et ainsi de différencier les ovocytes matures en métaphase II (ayant expulsé le premier globule polaire) des ovocytes immatures (absence de globule polaire).

Les zygotes obtenus à J1 après une FIV classique ou les ovocytes injectés à J0 lors d'une ICSI sont placés individuellement dans des boîtes de culture 12 puits. Chaque puits contient du milieu de culture et est recouvert d'huile minérale. Les boîtes sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C sous 6% de CO₂, 5% d'O₂ et 89% de N₂.

2) LA CULTURE

La CP au stade de blastocyste peut être réalisée par le biais de deux types de milieux de culture:

- Culture séquentielle: Les embryons sont cultivés successivement dans des milieux qui présentent deux compositions chimiques différentes adaptées aux conditions nutritionnelles des embryons à chaque étape de leur développement. Les embryons sont cultivés dans un premier milieu depuis le stade zygote (jour 1) jusqu'au jour 3 de leur développement. Ils sont ensuite plongés dans un second milieu de culture, du 3^{ème} jour jusqu'au 6^{ème} jour.

Au sein de notre centre les milieux séquentiels ont été utilisés jusqu'en 2014.

- Culture en milieu unique: Les embryons sont cultivés dans ce type de milieu du 1^{er} jour au 6^{ème} jour de culture. Ils trouveront dans ce milieu tous les nutriments dont ils auront besoin au cours de leur développement.

Les milieux uniques sont utilisés dans notre centre depuis 2015.

B) ÉVALUATION DE L'ASPECT MORPHOLOGIQUE DES EMBRYONS

L'évaluation de l'aspect morphologique des ovocytes, zygotes et embryons s'observe au microscope inversé aux grossissements x200 et x400.

La fécondation (J1) 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 pronucleï (PN) et des globules polaires (GP). Il y a fécondation « normale » dès lors qu'il est observé 2 PN et 2 GP.

1) CLASSIFICATION BLEFCO DES EMBRYONS OBTENUS À J2

À 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.

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

Un code à 3 chiffres est établi de la façon suivante:

- Le premier chiffre correspond au **nombre de cellules ou blastomères** de l'embryon à J2. Ce premier chiffre fluctue généralement entre 2 et 6 à J2.
- Le deuxième chiffre correspond à la **régularité des cellules**, évaluée en observant la taille des cellules.
 - Valeur 1: les cellules sont de tailles régulières entre elles
 - Valeur 2: les cellules sont de tailles différentes entre elles
- Le troisième chiffre correspond à la **proportion de fragments cytoplasmiques**
 - Valeur 1: moins de 10% de fragments cytoplasmiques
 - Valeur 2: entre 10% et 50% de fragments cytoplasmiques
 - Valeur 3: plus de 50% de fragments cytoplasmiques

Selon cette classification, un embryon est considéré comme étant de «top qualité» lorsqu'il présente un aspect de type 411 à J2 soit 4 cellules régulières avec moins de 10% de fragments (**cf Figure 15**).



Figure 15:
Embryon de type 411

2) CLASSIFICATION DES BLASTOCYSTES OBTENUS À J5 OU À J6

Le stade blastocyste représente l'étape finale du développement embryonnaire une semaine après la fécondation. Ce stade est marqué par le développement d'une masse cellulaire interne à l'origine de l'embryon proprement dit, d'un blastocèle et d'un trophoctoderme, médiateur de l'implantation et de la formation du placenta.

Dans notre centre, une description morphologique du blastocyste est effectuée selon la classification du Dr D.Gardner (**cf Figure 16**) (Gardner et al, 1998). Une classification a été établie, regroupant ces 3 paramètres et pouvant être une aide pour la décision du devenir du blastocyste (transfert, congélation, élimination). En effet, il a été mis en évidence une corrélation entre l'aspect morphologique des blastocystes et leur taux d'implantation (Gardner et al, 2000). Un embryon n'est jamais conservé en culture au-delà de J6.

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)






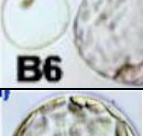
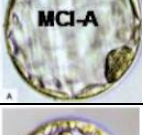

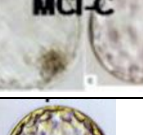
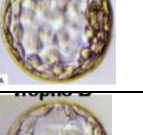


Degré d'expansion du blastocèle	B1	Blastocyste non expansé (jeune) Blastocèle < 50% du volume	
	B2	Blastocyste non expansé (jeune) Blastocèle > 50% du volume mais <100%	
	B3	Blastocyste non expansé (complet - « full ») Blastocèle = 100% du volume	
	B4	Blastocyste expansé non éclos Augmentation du volume du blastocèle Amincissement de la zone pellucide	
	B5	Blastocyste expansé en cours d'éclosion (« Hatching ») Rupture de la zone pellucide	
	B6	Blastocyste éclos (« Hatched ») Séparation de la zone pellucide et du blastocyste	
Aspect des cellules de la masse cellulaire interne (uniquement à partir de B3)	A	Cellules nombreuses bien compactées	
	B	Cellules moins nombreuses peu compactées	
	C	Peu de cellules	
Aspect des cellules du trophoctoderme (uniquement à partir de B3)	A	Nombreuses cellules formant un épithélium continu	
	B	Peu de cellules formant un épithélium lâche	
	C	Très peu de cellules	

Figure 16:

Caractéristiques morphologiques des blastocystes selon les critères établis par Gardner et Schoolcraft (Gardner et al, 1998)

L'aspect morphologique des blastocystes a fait l'objet de différentes classifications internationales. Dans ce travail, nous avons réalisé, après analyse et comparaison avec ces dernières, une classification qui nous paraissait la plus cohérente avec les données de notre centre (**cf Tableau II**). Selon le stade d'expansion et l'organisation des cellules, les blastocystes sont classés en grade (« Early », « Good », « Average » et « Poor ») correspondant à leur morphologie.

Tableau II:
Classification de la morphologie des blastocystes

Early (B1-B2)		Full / Expanded / Hatched (B3-B6)	
Early	Good	Average	Poor
	AA	AC/CA	CC
	AB/BA	BC/CB	
	BB		

C) STRATÉGIE DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE DU CENTRE

La stratégie de transfert des blastocystes dans notre centre tient compte de 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 réalise sa première ou seconde ponction.
- Un transfert de deux blastocystes est recommandé pour toutes les femmes à partir de la 3^{ème} ponction et dès la 1^{ère} ponction à partir de 37 ans.

D) MESURE DES RÉSULTATS

1) BIOLOGIE

A partir du logiciel métier du centre, nous avons analysé les paramètres suivants; le nombre d'ovocytes recueillis à la ponction ovarienne, l'aspect morphologique des embryons, la proportion de blastocystes obtenus à J5 et J6, le stade d'expansion des blastocystes à J5 et J6, l'organisation cellulaire des blastocystes, la proportion de blastocystes utiles, et parmi eux, la proportion de blastocystes congelés et transférés.

Le taux de blastocyste est le rapport entre le nombre de blastocystes obtenus à J5 ou J6 et le nombre d'embryons mis en CP à J2.

2) CLINIQUE

Le dosage sérique d'hCG est réalisé 7 jours après le transfert embryonnaire. En cas de positivité, un second dosage sérique est pratiqué 48h plus tard afin d'évaluer son évolution. Une grossesse est considérée comme clinique dès que le dosage sérique est supérieur à 1000 UI/L (3^{ème} dosage réalisé une semaine après le second).

Une échographie est effectuée 5 semaines après le transfert afin de visualiser le ou les sacs gestationnels ainsi que la présence ou non d'une activité cardiaque. Une grossesse est considérée comme évolutive lorsqu'une activité cardiaque est observée.

Le taux d'implantation est le rapport entre le nombre de sacs gestationnels et le nombre de blastocyste(s) transféré(s).

Le taux de naissance vivante par ponction est le rapport entre le nombre d'accouchements et le nombre de ponction ovarienne.

Nous avons aussi analysé le taux de transfert par ponction (en fonction du nombre d'ovocytes recueillis à la ponction ovarienne et selon l'aspect morphologique des embryons mis en CP à J2), le taux de FCC par grossesse clinique et le taux de grossesse multiple par naissance.

E) STATISTIQUES

Les données ont été extraites par le logiciel métier du centre (JFiV, Info FIV).

Les analyses statistiques ont été effectuées ensuite à l'aide du logiciel Statview version 5.0.

Le test statistique utilisé pour comparer deux variables qualitatives est le χ^2 . Pour comparer une variable quantitative et une variable qualitative nous avons utilisé le test t de Student. Le seuil de significativité était fixé à 5%. Une différence est dite significative si le p est inférieur à 0,05 ($p < 0,05$).

RÉSULTATS

I - ÂGE DE LA FEMME ET DEVENIR BIOLOGIQUE EN CULTURE PROLONGEE

A) TAUX GLOBAL DE BLASTOCYSTE

Le taux global de blastocyste comprend des blastocystes obtenus à J5 et J6, quelle que soit la morphologie des embryons mis en CP à J2 et quelle que soit la morphologie et le devenir des blastocystes obtenus: transfert, congélation ou élimination.

Dans un premier temps, nous avons raisonné en fonction de l'âge de la femme, de manière individuelle (âge par âge) (cf **Figure 17**), puis dans un second temps nous avons constitué des groupes en regard des données individuelles.

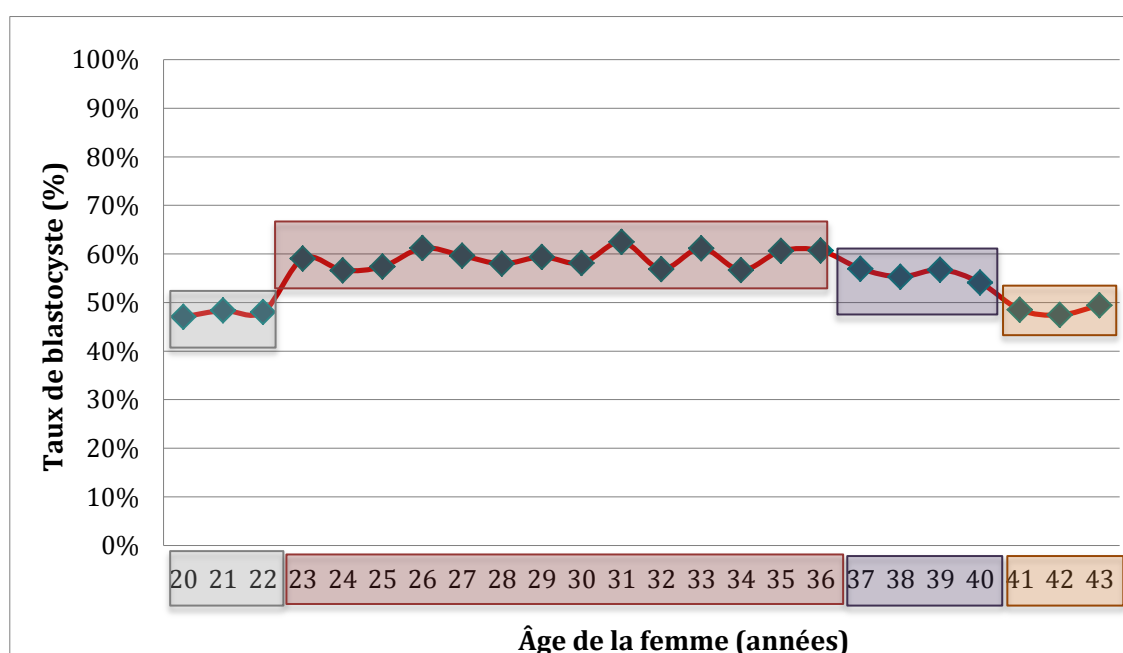


Figure 17:

Taux de blastocyste en fonction de l'âge de la femme

C'est parmi les femmes âgées de 23 à 36 ans que le taux moyen de blastulation est le plus élevé (59%, « range » 55-61%). Nous avons alors choisi cette tranche d'âge pour constituer notre groupe de référence.

Au regard de ces données individuelles, nous avons aussi constitué 3 autres groupes en se basant sur le taux de blastocyste: [20-22 ans], [37-40 ans] et [41-43 ans]. En effet, le taux de blastocyste est nettement diminué (<50%) pour les deux tranches d'âges « extrêmes » et est légèrement diminué pour les femmes de [37-40 ans].

En regard des données de la Figure 17, nous avons donc déterminé 4 tranches d'âges distinctes (cf Figure 18).

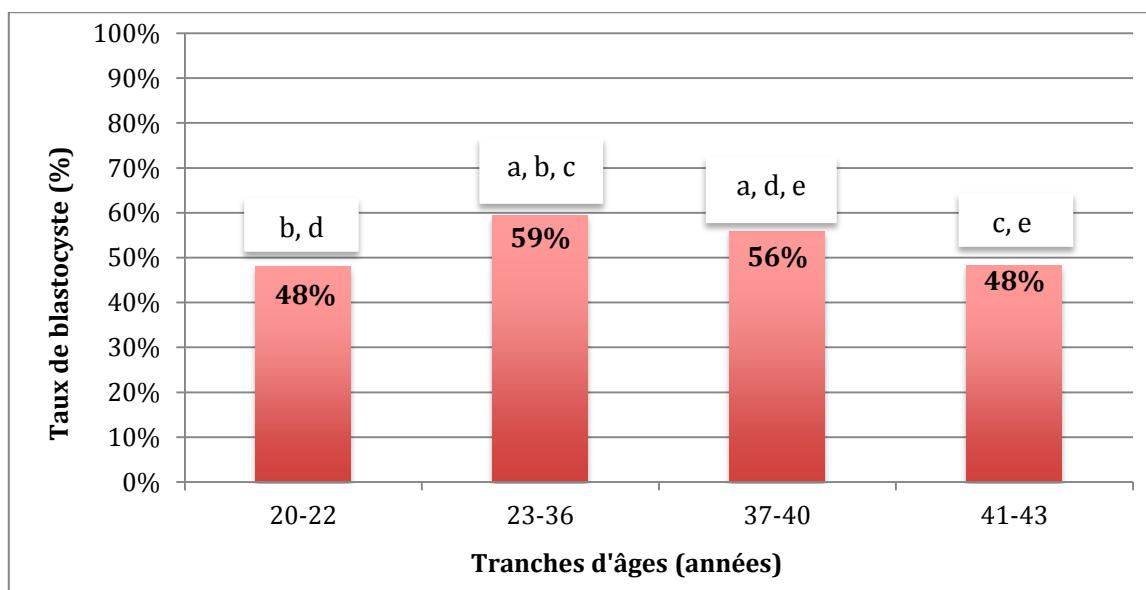


Figure 18:

Taux de blastocyste en fonction des tranches d'âge de la femme

Les barres affectées de la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$)

Il existe un impact négatif de l'âge sur les trois tranches d'âges pour l'obtention de blastocyste, en comparaison avec le groupe de référence:

- › les femmes âgées de 20 à 22 ans avec un taux de blastulation de 48% ($p < 0,0001$)
- › les femmes âgées de 37 à 40 ans avec un taux de blastulation de 56% ($p < 0,0001$)
- › les femmes âgées de 41 à 43 ans avec un taux de blastulation de 48% ($p < 0,0001$)

Concernant les femmes de [37-40 ans], il s'agit d'une tranche d'âge avec des résultats intermédiaires. En effet, elles ont significativement moins de chance d'obtenir un blastocyste que les femmes de [23 à 36 ans] mais plus de chance que les femmes de [20-22 ans] et [41-43 ans] ($p < 0,05$).

Dans notre centre, l'âge de 37 ans marque un point d'inflexion, servant de référence pour établir notre stratégie de transfert.

L'âge de la femme a une incidence sur le taux global de blastocyste.

A l'issue de cette observation préliminaire, nous avons construit le *flow-chart* suivant (cf **Figure 19**).

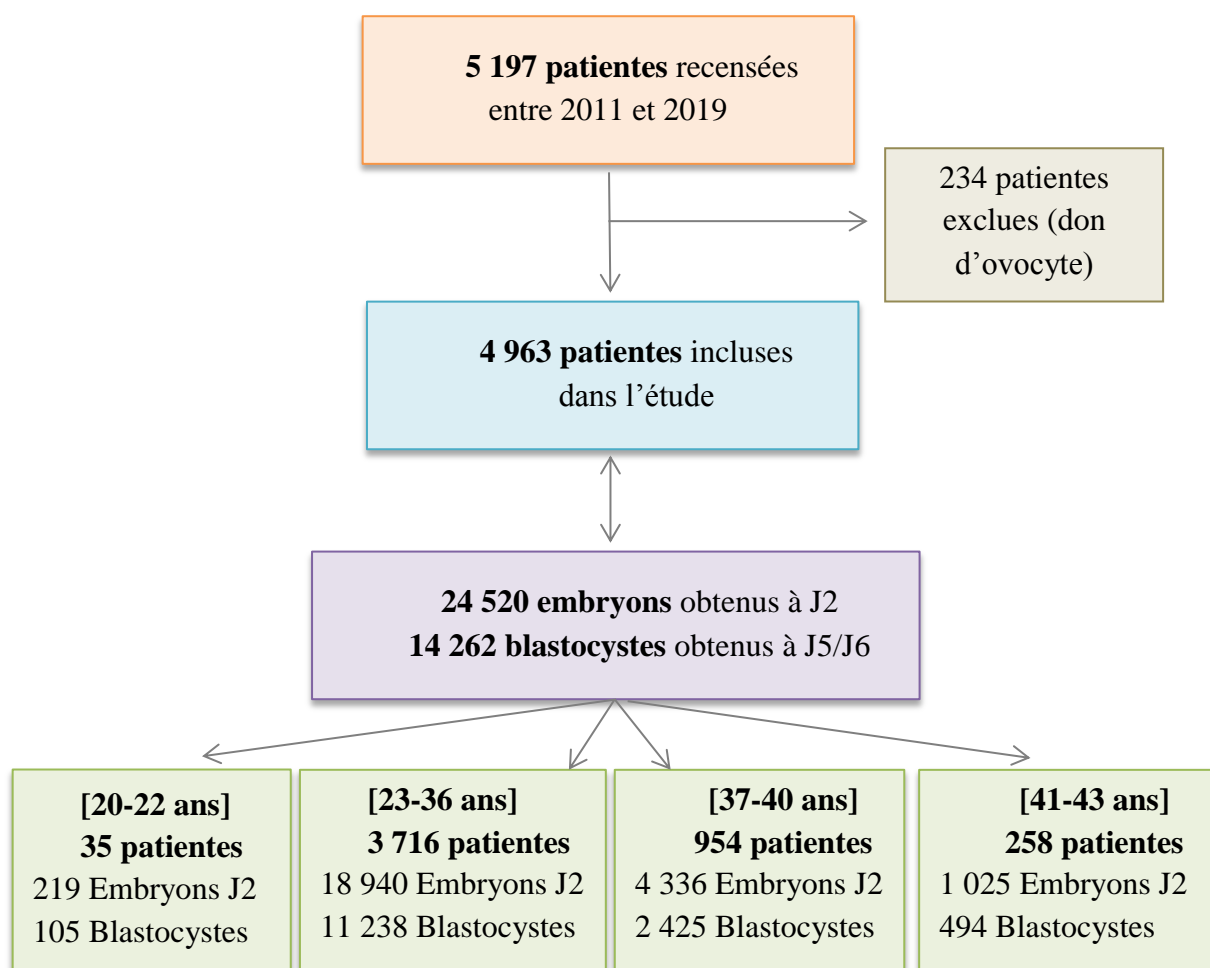


Figure 19:

Flow-chart de la population étudiée

Les caractéristiques de la population globale et des tranches d'âges sont présentées dans le tableau ci-dessous (cf **Tableau III**).

Tableau III:

Caractéristiques générales de la population étudiée

			Référence		
	Générale	[20-22 ans]	[23-36 ans]	[37-40 ans]	[41-43 ans]
Moyenne d'âge (années)	33 ± 4,5	21 ± 0,8	31 ± 3,3	38 ± 1,1	42 ± 0,7
N° demande	D1= 84% D2= 14% D3/D4= 2%	D1= 100%	D1= 85% D2= 14% D3/D4= 1%	D1= 81% D2= 18% D3/D4= 1%	D1= 88% D2= 11% D3/D4= 1%
Rang tentative	1,8 ± 1,1	1,3 ± 0,6	1,8 ± 1	2,1 ± 1,2	2,3 ± 1,3
Technique d'AMP	FIV= 38% ICSI= 62%	FIV= 14% ICSI= 86%	FIV= 39% ICSI= 61%	FIV= 39% ICSI= 61%	FIV= 43% ICSI= 57%
Nb ovocytes recueillis à la ponction ovarienne	9,8 ± 5,1	12,3 ± 6,6	10,1 ± 5,3	9 ± 4,5	8 ± 3,9
Nb d'eb total J2	5,9 ± 3,4	6,9 ± 4,9	6 ± 3,5	5,5 ± 3	5,1 ± 2,9
Nb d'eb TQE	1,1 ± 1,5	1,1 ± 1,6	1,1 ± 1,6	1,1 ± 1,5	0,9 ± 1,2
Nb d'eb mis en CP	5 ± 3,2	6,2 ± 4,9	5,2 ± 3,2	4,7 ± 2,8	4,1 ± 2,8
Moyenne tx blastocyste	56 ± 33,5	47 ± 31,6	58 ± 33	54 ± 33,1	46 ± 34
Congélation d'au moins un blastocyste par ponction	52%	43%	51%	39%	27%
Tx de transfert par ponction	83%	64%	83,5%	83%	82%
Nb de blastocyste transféré	1,13 ± 0,5	0.84 ± 0,37	1 ± 0.45	1,3 ± 0,6	1,5 ± 0,6
Tx de grossesse clinique par ponction	36%	29%	38%	32%	21%
Tx de naissance par ponction	30%	26%	32%	25%	14%

B) INFLUENCE DU NOMBRE D'OVOCYTES RECUEILLIS A LA PONCTION

Les femmes de [20-22 ans] n'ont pas été incluses dans les prochaines analyses statistiques car les effectifs étaient trop faibles (n= 35).

Dans le **Tableau IV**, il a été pris comme élément de comparaison 4 ovocytes issus de la ponction ovarienne afin de pouvoir comparer nos résultats avec la littérature (Scholtes et al, 1998). Avec ce seuil, pour une tranche d'âge donnée, il n'y a pas de différence significative sur le taux de blastocyste ($p>0,05$). Cette observation est valable pour chaque tranche d'âge.

Tableau IV:

Influence de l'âge de la femme sur le taux global de blastocyste en fonction du nombre d'ovocytes recueillis à la ponction

	F23-36		F37-40		F41-43	
	Ovo \leq 4	Ovo $>$ 4	Ovo \leq 4	Ovo $>$ 4	Ovo \leq 4	Ovo $>$ 4
Nb de couples	365	3340	141	805	46	215
Taux global de blastocyste	58%	58%	55%	54%	40%	48%
p	NS		NS		NS	

Quel que soit l'âge de la femme, le nombre d'ovocytes recueillis à la ponction n'influence pas le taux de blastocyste ($p>0,05$).

C) INFLUENCE DE L'ASPECT MORPHOLOGIQUE DES EMBRYONS MIS EN CULTURE PROLONGÉE À J2

Dans le **Tableau V**, il a été pris comme élément de comparaison, l'obtention de 3 TQE afin de pouvoir comparer nos résultats avec la littérature (Tannus et al, 2017a).

D'après le **Tableau V**, pour les femmes de [23-36 ans], si le nombre de TQE mis en CP est inférieur à 3, elles ont alors significativement moins de chance d'obtenir un blastocyste que si elles avaient 3 embryons ou plus de « top qualité » (55% versus 73%). Il en est de même pour les femmes de [37-40 ans] (50% versus 71%).

Pour les femmes de [41-43 ans], une tendance est aussi observée mais sans atteindre la significativité ($p=0,0750$). Cela peut s'expliquer par l'écart important d'effectif.

Tableau V:

Influence de l'âge de la femme sur le taux de blastocyste en fonction du nombre d'embryons de top qualité mis en CP à J2.

	F23-36		F37-40		F41-43	
	TQE < 3	TQE ≥ 3	TQE < 3	TQE ≥ 3	TQE < 3	TQE ≥ 3
Nb de couples	3079	581	779	154	222	32
Taux global de blastocyste	55%	73%	50%	71%	44%	56%
p	<0,05		<0,05		0,0750	

Le nombre de TQE à J2 est un indicateur de la qualité morphologique de la cohorte embryonnaire.
De manière générale, le nombre de TQE disponible à J2 influence le taux de blastocyste ($p<0,05$).

D) CINÉTIQUE DES BLASTOCYSTES OBTENUS

Nous nous sommes ensuite posés la question suivante: Quand une femme obtient un blastocyste (quelle que soit sa morphologie), sa cinétique de développement (J5 vs J6) est-elle influencée par l'âge de la femme?

En regard de la **Figure 20**, on constate que, parmi les femmes obtenant des blastocystes lors d'une tentative de FIV, la proportion de blastocystes obtenus à J5 est voisine de 70% quel que soit l'âge des femmes (69 à 72%). 30% des blastocystes sont donc obtenus à J6 pour toutes les tranches d'âges (28 à 31%).

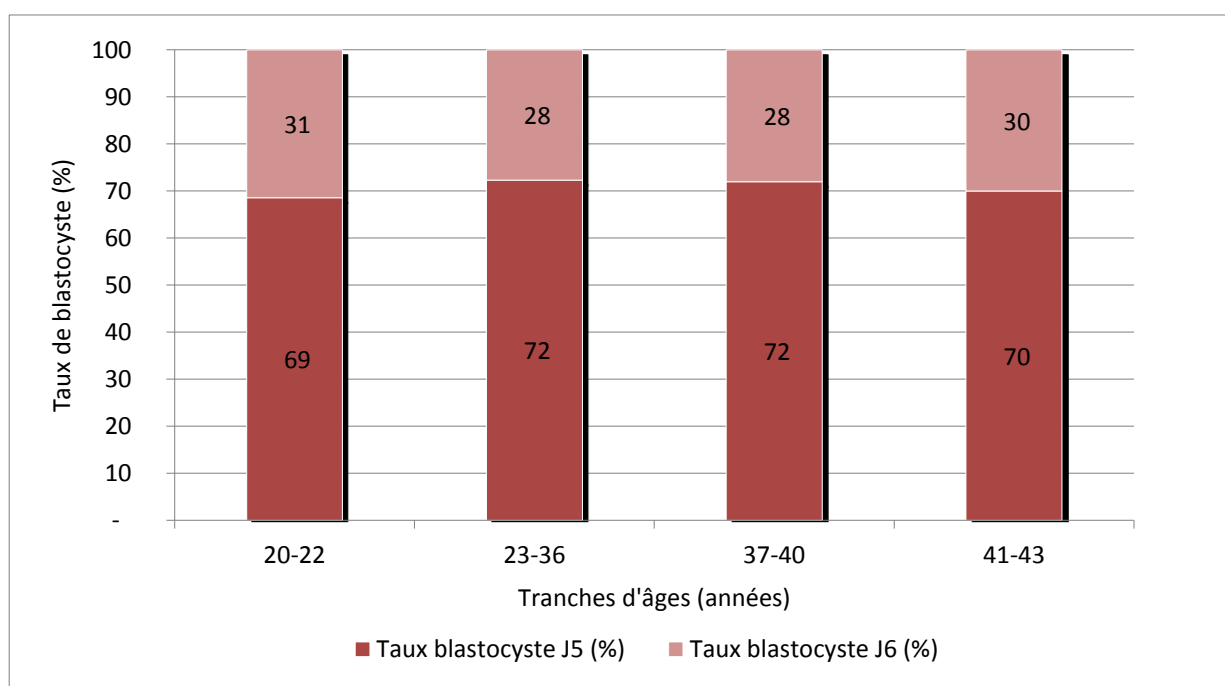


Figure 20:

Proportion de blastocystes obtenus à J5 ou J6 en fonction de l'âge de la femme

L'âge de la femme n'influence pas la cinétique d'obtention des blastocystes quand celle-ci est appréciée sous forme de jour d'obtention du blastocyste (J5 vs J6) ($p > 0,05$).

E) MORPHOLOGIE DES BLASTOCYSTES OBTENUS

1) STADES D'EXPANSION

Nous nous sommes ensuite demandé si le stade d'expansion du blastocyste était influencé par l'âge de la femme pour un jour donné.

5.1 - Stade d'expansion à J5

A J5, quand l'âge de la femme augmente, il y a une diminution de la proportion de blastocystes expansés (B4-B6), et une augmentation en miroir de jeunes blastocystes (B1-B2) (Cf **Figure 21 et Tableau VI**). Une inversion s'observe aussi chez les femmes âgées de 41 ans et plus. Cette observation n'est pas confirmée chez les femmes de [20-22 ans], probablement en raison d'effectifs insuffisants des sous-groupes.

Cette analyse semble montrer que, globalement les blastocystes de femmes AMA présentent un certain retard de croissance à J5 (plus de blastocystes jeunes, et moins de blastocystes expansés).

Tableau VI:

Stade d'expansion des blastocystes obtenus à J5 en fonction de l'âge de la femme

F20-22			F23-36			F37-40			F41-43		
B1-B2	B3	B4-B6	B1-B2	B3	B4-B6	B1-B2	B3	B4-B6	B1-B2	B3	B4-B6
N= 72 embryons J2			N= 8 104 embryons J2			N= 1 748 embryons J2			N= 347 embryons J2		
26%	42%	32%	28%	29%	43%	35%	28%	37%	41%	29%	29%

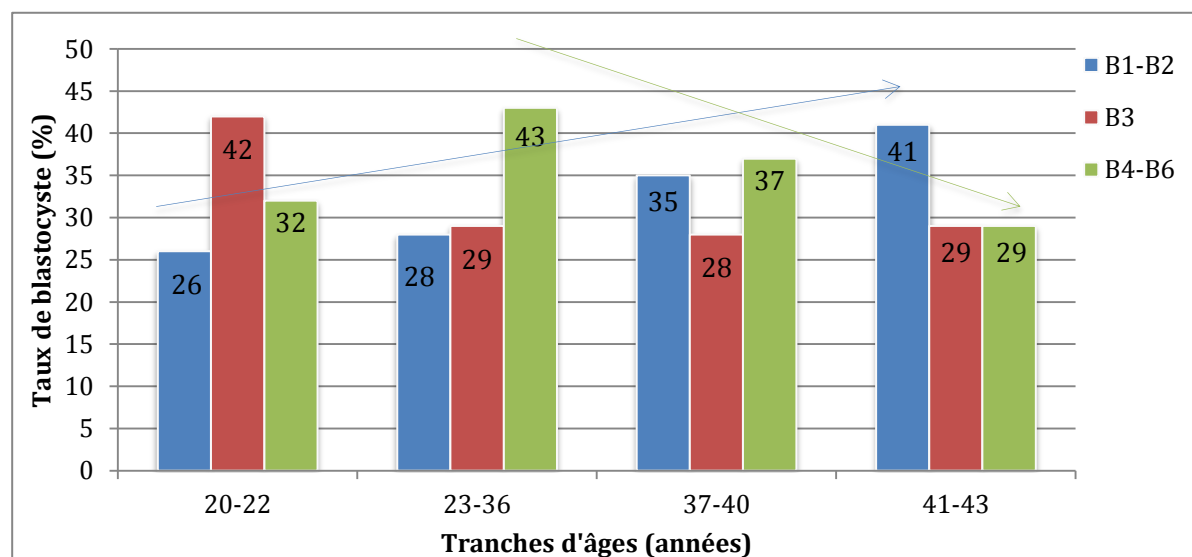


Figure 21:

Stade d'expansion des blastocystes obtenus à J5 en fonction de l'âge de la femme

A J5, le stade d'expansion du blastocyste est affecté par l'âge de la femme ($p < 0,05$). En effet, quand l'âge de la femme augmente, la cinétique des blastocystes (exprimée sous forme de stade d'expansion) est ralentie.

5.2 - Stade d'expansion à J6

Comme observé dans le **Tableau VII** et la **Figure 22**, il existe, de façon similaire à J5, une diminution du taux de blastocyste expansé avec l'âge et en parallèle, une augmentation du taux de blastocyste jeune. Cela est vérifié pour toutes les classes d'âges.

Tableau VII:

Stade d'expansion des blastocystes obtenus à J6 en fonction de l'âge de la femme

F20-22			F23-36			F37-40			F41-43		
B1-B2	B3	B4-B6	B1-B2	B3	B4-B6	B1-B2	B3	B4-B6	B1-B2	B3	B4-B6
N= 33 embryons J2			N= 1251 embryons J2			N= 985 embryons J2			N= 570 embryons J2		
3%	44%	64%	18%	27%	55%	19%	29%	52%	22%	30%	48%

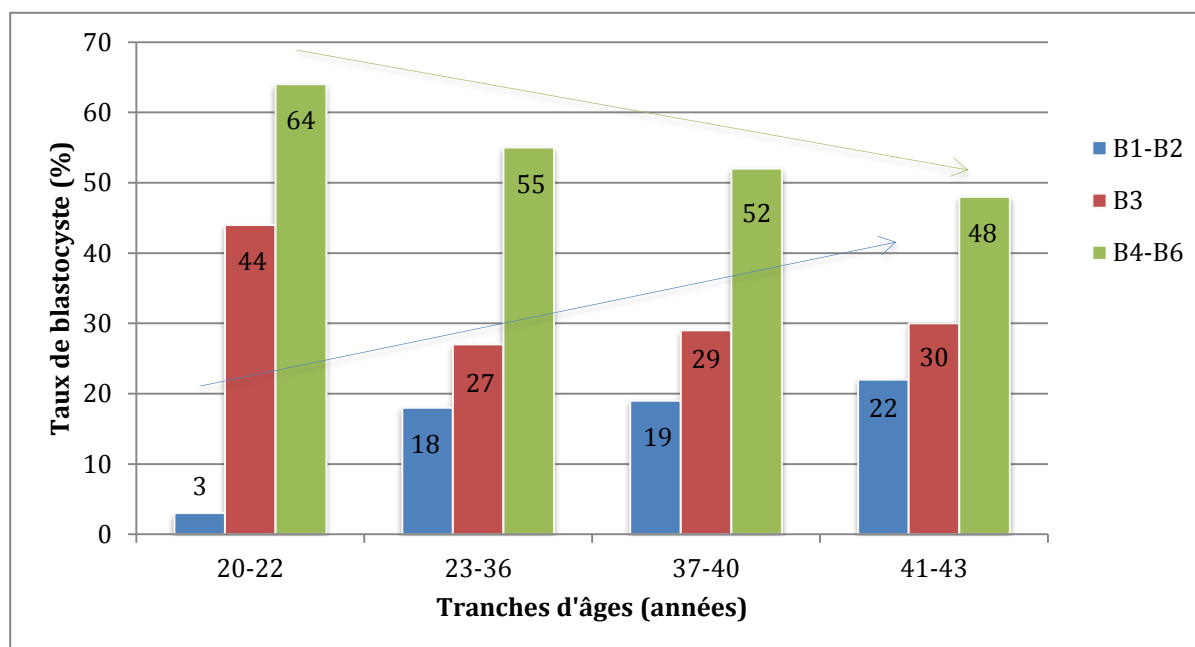


Figure 22:

Stade d'expansion des blastocystes obtenus à J6 en fonction de l'âge de la femme

A J6, le stade d'expansion du blastocyste obtenu est affecté par l'âge de la femme ($p < 0,05$).

2) MORPHOLOGIE DETAILLÉE A J5

Nous nous sommes ensuite intéressés au lien entre l'âge de la femme et l'organisation des cellules du trophectoderme et de la masse cellulaire interne des blastocystes développés à J5.

Afin de catégoriser les blastocystes, nous avons utilisé la classification décrite dans la section Matériel et Méthode.

D'après la **Figure 23**, la morphologie des blastocystes n'est pas significativement affectée ($p>0,05$) par l'âge de la femme. Une femme de [41-43 ans] a autant de probabilité d'obtenir un blastocyste de morphologie « good » qu'une femme de [23-36 ans].

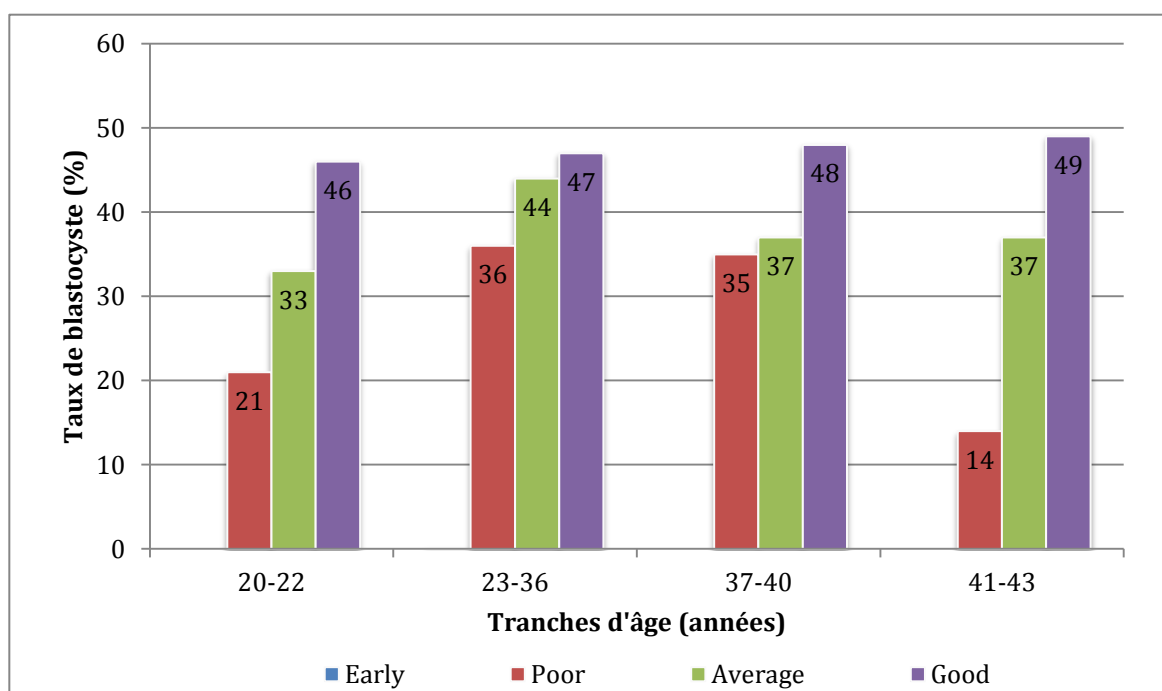


Figure 23:

Morphologie des blastocystes J5 en fonction de l'âge de la femme

A J5, l'organisation cellulaire n'est pas affectée par l'âge de la femme ($p>0,05$).

F) DEVENIR DES BLASTOCYSTES OBTENUS: NOTION DE BLASTOCYSTE UTILE

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de l'âge de la femme sur l'obtention de blastocystes dits « utiles ». Un blastocyste est considéré comme « utile » à J5 ou J6 s'il est utilisé pour un transfert ou pour une congélation.

Comme décrit sur la **Figure 24**, les femmes des différentes classes d'âge ont autant de chance d'obtenir des blastocystes dits « utiles ». Toutefois les femmes de [23-36 ans] obtiennent significativement moins de blastocystes utiles que les femmes de [37-40 ans]. Environ 70% des blastocystes obtenus sont soit transférés, soit congelés. Les blastocystes « inutiles » sont donc non conservés.

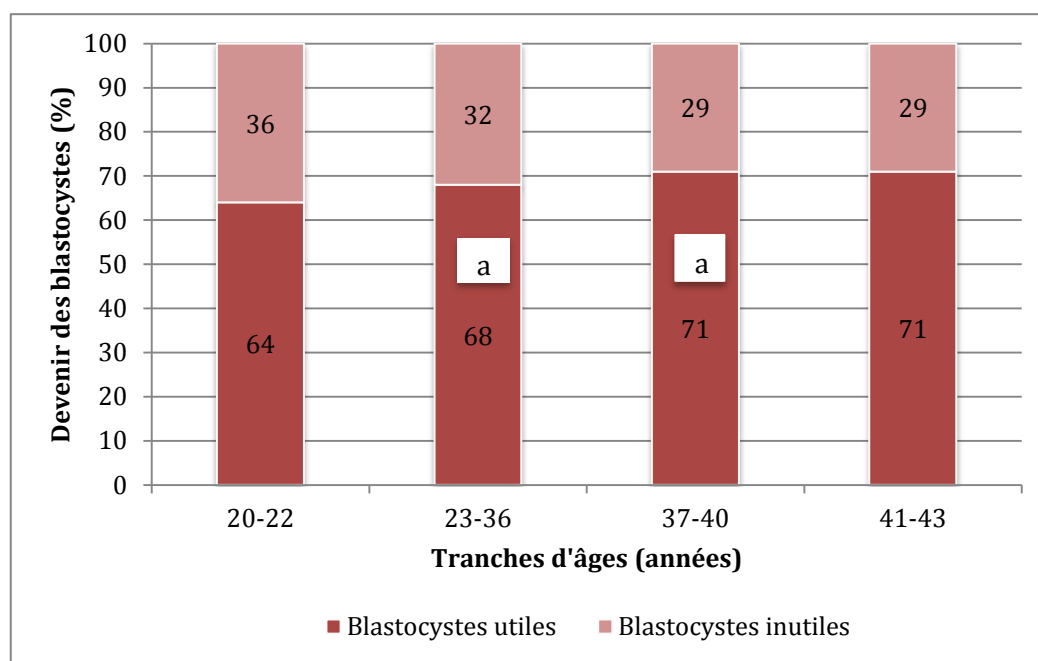


Figure 24:

Proportion de blastocystes "utiles" ou "inutiles" en fonction de l'âge de la femme

Les barres affectées de la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Le taux de blastocystes « utiles » n'est globalement pas influencé par l'âge de la femme.

A la suite de cette analyse, nous avons regardé, parmi les blastocystes « utiles », quelle était la proportion de blastocystes transférés ou congelés selon l'âge de la femme.

Sur la **Figure 25** suivante, il est observé avec l'âge une inversion significative ($p < 0,05$) du rapport blastocystes congelés/blastocystes transférés. En effet, une femme âgée de 20 à 36 ans, aura une proportion accrue de blastocystes congelés par rapport à une femme de 37 ans et plus.

Cela peut s'expliquer par le fait que, selon la stratégie de transfert de notre centre, pour les femmes âgées de moins de 37 ans, le transfert d'un seul blastocyste est privilégié, alors que deux blastocystes seront transférés chez les femmes à partir de 37 ans. Cela leur laissera donc moins de blastocystes disponibles à la congélation.

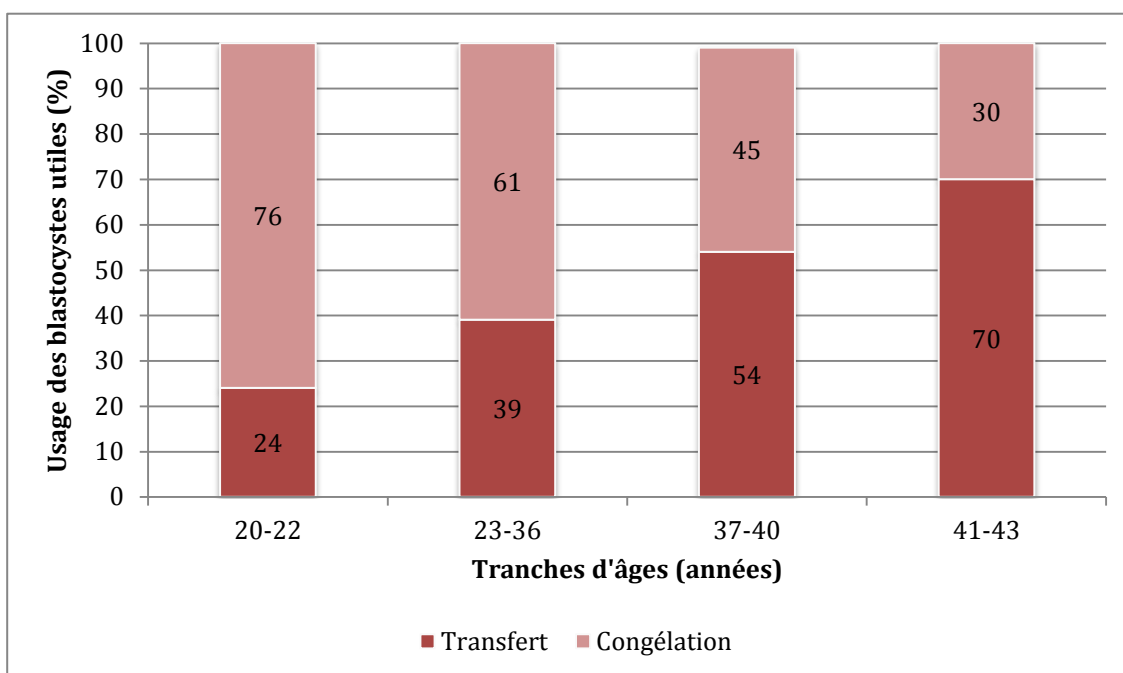


Figure 25:

Proportion de blastocystes transférés ou congelés parmi les blastocystes « utiles »

Lorsque l'âge de la femme augmente, la part de blastocystes disponibles pour la congélation diminue de manière significative ($p < 0,05$); le transfert frais d'un nombre accru de blastocystes étant privilégié.

II – ÂGE DE LA FEMME ET DEVENIR CLINIQUE APRES CULTURE PROLONGEE

A) TAUX DE TRANSFERT

Afin d'étudier le taux de transfert pour les situations habituelles, nous avons exclu les femmes pour lesquelles nous avons dû congeler l'ensemble de la cohorte embryonnaire pour des raisons diverses telles que: hyperstimulation ovarienne, endomètre non adéquat, « Freeze All »,...

1) *TAUX GLOBAL DE TRANSFERT*

Le taux global de transfert de blastocyste est de 80%, environ, pour l'ensemble de la population.

D'après la **Figure 26**, il existe une différence significative en ce qui concerne le taux global de transfert de blastocyste ($p=0,02$). Les femmes de [20-22ans] ont moins de probabilité d'obtenir un transfert que les femmes de [23-36 ans] et [37-40 ans].

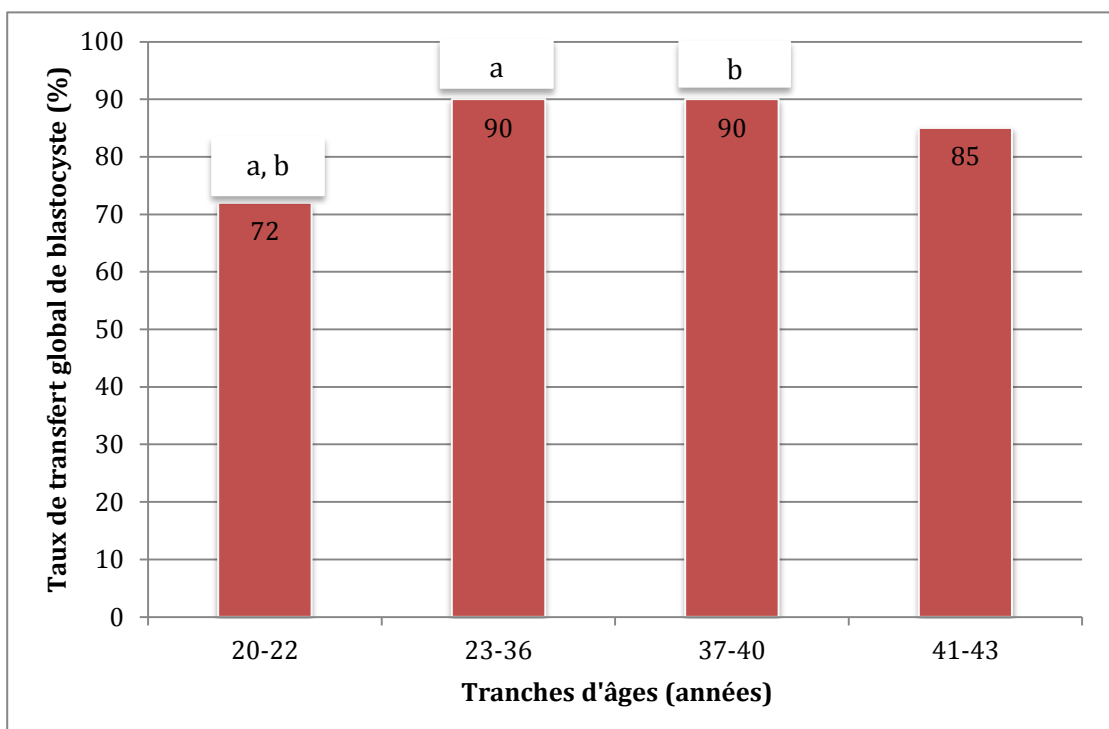


Figure 26:

Taux global de transfert de blastocyste en fonction de l'âge de la femme

Les barres affectées de la même lettre sont significativement différentes ($p<0,05$).

Le taux global de transfert de blastocyste est relativement stable quel que soit l'âge de la femme, hormis pour les femmes les plus jeunes.

2) TAUX DE TRANSFERT EN FONCTION DU NOMBRE D'OVOCYTES RECUEILLIS A LA PONCTION

Les femmes de [20-22 ans] n'ont pas été incluses dans les analyses statistiques ci-dessous car les effectifs étaient trop peu importants.

Nous nous sommes intéressés ensuite à l'incidence de l'âge de la femme sur le taux de transfert en intégrant aussi le nombre d'ovocytes obtenus à la ponction.

D'après le **Tableau VIII**, on comprend que, globalement, pour toutes les tranches d'âges, le taux de transfert est significativement impacté par le nombre d'ovocytes recueillis à la ponction ovarienne. Ainsi, pour une femme issue de notre groupe de référence [23-36 ans], si 4 ovocytes ou moins ont été recueillis à la ponction, alors elle aura significativement moins de chance d'avoir un transfert. Cette observation est aussi valable pour les autres tranches d'âges. Il est à noter que pour les femmes présentant 4 ovocytes ou moins à la ponction le taux de transfert est au minimum de 70% et peut dépasser 80%.

Tableau VIII:

Influence de l'âge de la femme sur le taux de transfert en fonction du nombre d'ovocytes recueillis à la ponction

	F23-36		F37-40		F41-43	
	Ovo ≤ 4	Ovo > 4	Ovo ≤ 4	Ovo > 4	Ovo ≤ 4	Ovo > 4
Nb de couples	282	2435	116	639	33	159
Taux de transfert	79%	91%	81%	91%	70%	88%
p	<0,0001		0,001		0,016	

Pour chaque tranche d'âge, le taux de transfert est significativement plus faible si le nombre d'ovocytes est inférieur ou égal à 4.

3) TAUX DE TRANSFERT EN FONCTION DE L'ASPECT MORPHOLOGIQUE DES EMBRYONS MIS EN CULTURE PROLONGEE A J2

Les femmes de [20-22 ans] n'ont pas été incluses dans les analyses statistiques ci-dessous car les effectifs étaient trop faibles.

Concernant l'incidence du nombre de TQE à J2 sur le taux de transfert en fonction des tranches d'âge, d'après le **Tableau IX**, nos données indiquent que pour notre groupe de référence [23-36 ans], si le nombre de TQE à J2 est inférieur à 3, alors elles ont significativement moins de chance de bénéficier d'un transfert que si elles avaient 3 TQE ou plus (81% versus 90%). Il en est de même pour toutes les autres tranches d'âges. Il est à remarquer que même à moins de 3 TQE disponibles à J2, le taux global de transfert reste élevé (>80%).

Tableau IX:

Influence de l'âge de la femme sur le taux de transfert en fonction du nombre d'embryons de top qualité observé à J2

	F23-36		F37-40		F41-43	
	TQE < 3	TQE ≥ 3	TQE < 3	TQE ≥ 3	TQE < 3	TQE ≥ 3
Nb de couples	2425	528	615	141	159	32
Taux de transfert	88%	98%	88%	98%	82%	100%
p	<0,0001		0,0009		0,0185	

Quel que soit l'âge de la femme, le nombre de TQE disponible à J2 influence le taux de transfert ($p < 0,05$).

En comparant le taux de TQE avec le nombre d'ovocytes recueillis à la ponction en fonction de l'âge de la femme, nous avons constaté que les femmes, quel que soit leur âge, ont la même probabilité d'obtenir un TQE indifféremment du nombre d'ovocytes recueillis (Cf Tableau X).

Tableau X:

Influence de l'âge sur le taux d'embryon 411 en fonction du nombre d'ovocytes recueillis à la ponction

	F23-36		F37-40		F41-43	
	Ovo ≤ 4	Ovo > 4	Ovo ≤ 4	Ovo > 4	Ovo ≤ 4	Ovo > 4
Taux de TQE	17%	18%	21%	19%	21%	16%
p	NS		NS		NS	

Quel que soit le nombre d'ovocytes recueillis à la ponction, les femmes ont la même chance d'obtenir un embryon de « top qualité ».

B) TAUX D'IMPLANTATION

Par la suite, nous avons analysé l'influence de l'âge de la femme sur le taux d'implantation.

D'après la **Figure 27**, en aval du groupe de référence, nous pouvons observer une décroissance par pallier du taux d'implantation avec l'âge. En effet, ce taux passe de 45% chez les femmes âgées de [23-36 ans], à 33% chez les femmes de [37-40 ans] puis à 19% pour les femmes de [41-43 ans].

De plus, nous observons que les femmes de [23-36 ans] et de [37-40 ans] ont significativement plus de chance d'obtenir un meilleur taux d'implantation par rapport aux femmes de [41-43 ans]. Les femmes de [37-40 ans] représentent la tranche d'âge avec des résultats intermédiaires en raison d'un taux d'implantation significativement plus faible que les femmes de [23-36 ans].

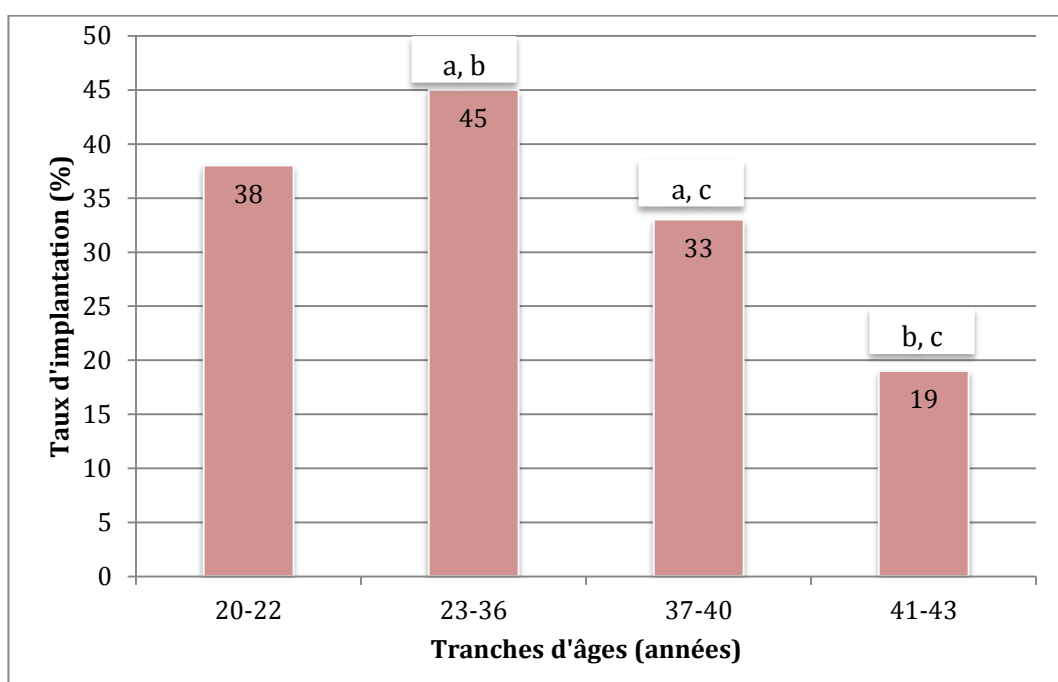


Figure 27:

Taux d'implantation selon les tranches d'âges de la femme

Les barres affectées de la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Le taux d'implantation est influencé par l'âge de la femme ($p < 0,05$).

C) TAUX DE GROSSESSE CLINIQUE PAR PONCTION

Nous avons ensuite analysé l'influence de l'âge de la femme sur le taux de grossesse clinique par ponction.

Observation préliminaire: Le nombre moyen de blastocyste transféré en fonction de l'âge augmente avec l'âge (Cf **Tableau XI**). Cela est cohérent avec notre stratégie de transfert.

Tableau XI:

Nombre moyen de blastocyste transféré en fonction de l'âge

Tranches d'âges (années)	Nombre moyen de blastocyste transféré
20-22	1 ± 0
23-36	$1,1 \pm 0,4$
37-40	$1,4 \pm 0,5$
41-43	$1,6 \pm 0,5$

De façon similaire au taux d'implantation, au-delà du groupe de référence nous observons, d'après la **Figure 28** une décroissance par pallier du taux de grossesse clinique par ponction avec l'âge (41 à 21%).

Les femmes de [23-36 ans] et de [37-40 ans] ont significativement plus de chance d'obtenir une grossesse clinique par ponction que les femmes de [41-43 ans]. Les femmes de [37-40 ans] présentent un taux de grossesse clinique par ponction significativement plus faible que les femmes de [23-36 ans].

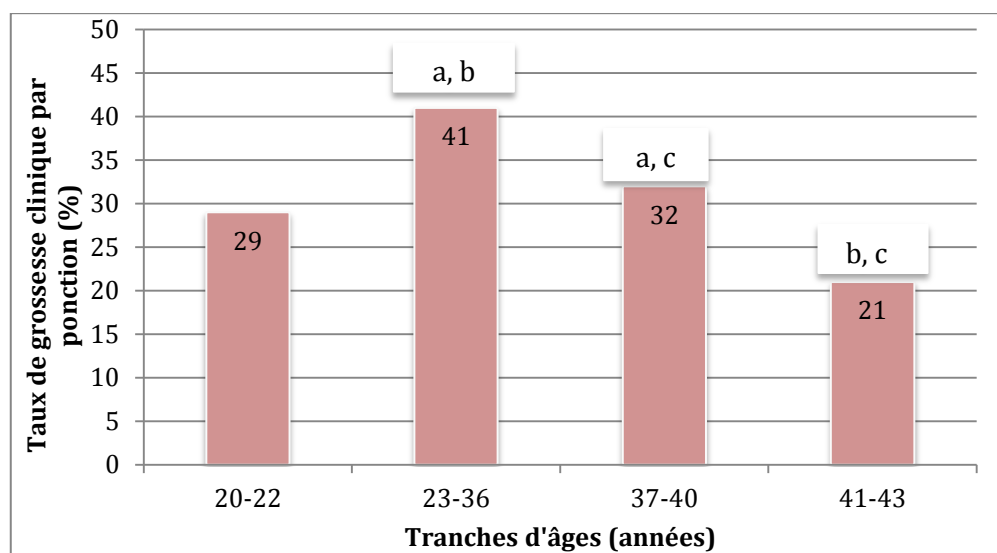


Figure 28:

Taux de grossesse par ponction selon les tranches d'âges de la femme

Le taux de grossesse clinique est globalement influencé par l'âge de la femme ($p < 0,05$). Des valeurs plus péjoratives sont observées aux 2 âges extrêmes de prise en charge. En considérant la relative faiblesse du groupe des femmes de [20-22 ans], ce taux de grossesse clinique doit encore être interprété avec prudence.

D) TAUX DE FAUSSE COUCHE CLINIQUE PAR GROSSESSE CLINIQUE

Concernant le taux de FCC par grossesse clinique, nous pouvons observer sur la **Figure 29**, qu'il augmente progressivement avec l'âge. Il est inférieur à 15% pour les femmes de 36 ans et moins, puis devient supérieur à 20% à partir de 37 ans.

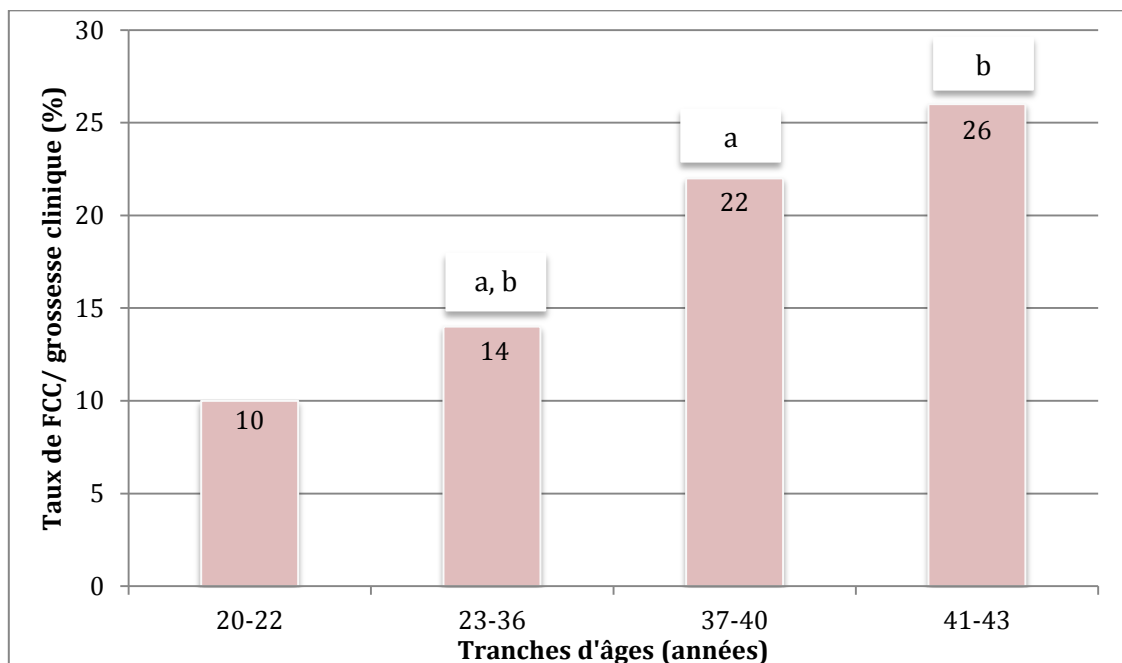


Figure 29:

Taux de FCC par grossesse clinique selon les tranches d'âges de la femme

Les barres affectées de la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Le taux de FCC augmente globalement significativement (10 à 26%) avec l'âge de la femme.

E) TAUX DE NAISSANCE PAR PONCTION

Puis nous nous sommes intéressés au taux de naissance par ponction.

D'après la **Figure 30** et en aval du groupe de référence, il existe une diminution du taux de naissance par ponction en fonction de l'âge (32 à 14%).

Les femmes de [23-36 ans], qui constituent notre groupe de référence, présentent un taux de naissance par ponction significativement plus élevé que les femmes des autres tranches d'âges. Il n'existe pas de différence significative entre les autres groupes.

En moyenne, dans notre centre, pour obtenir une naissance chez les femmes de 37 ans et plus, le nombre de blastocystes transférés est de 1,5.

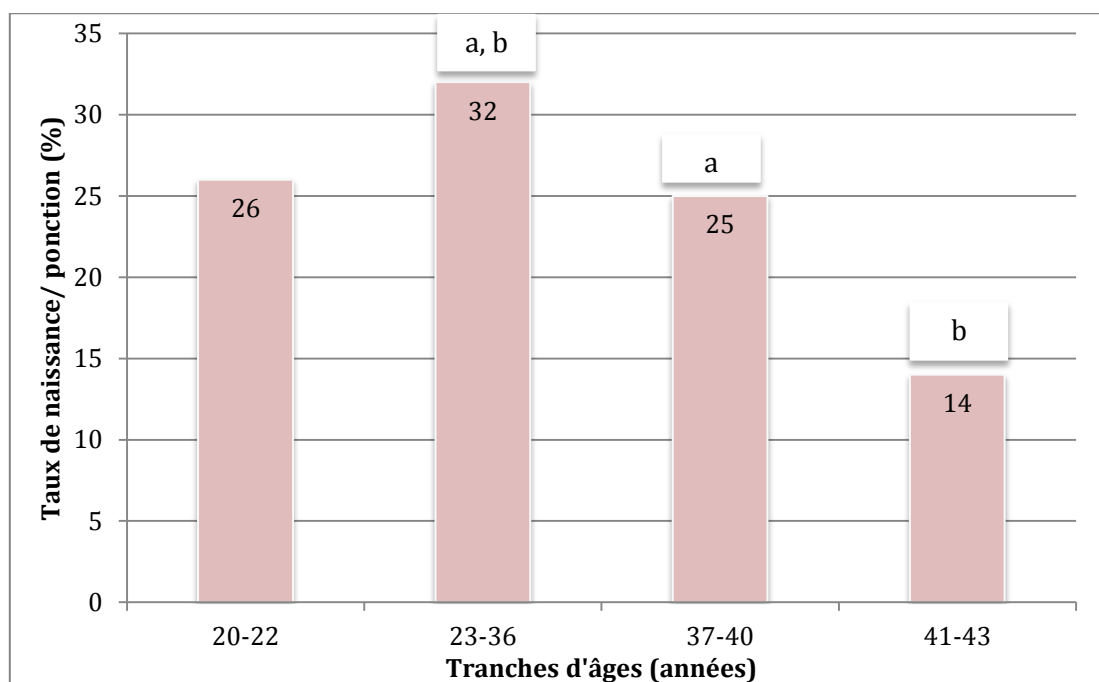


Figure 30:

Taux de naissance par ponction selon les tranches d'âges de la femme

Les barres affectées de la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Une diminution du taux de naissance par ponction selon l'âge de la femme est observée ($p < 0,05$).

F) TAUX DE GROSSESSE MULTIPLE PAR NAISSANCE

Enfin, nous avons analysé l'influence de l'âge de la femme sur le taux de grossesse multiple par naissance.

Parmi les 166 grossesses multiples obtenues, seules 2 sont des grossesses triples. Elles ont été observées toutes les 2 dans le groupe de référence.

D'après la **Figure 31** et au-delà du groupe de référence, nous pouvons constater une relative stabilité concernant le taux de grossesse multiple par naissance (8-14%) en fonction de l'âge de la femme.

Dans notre centre, en moyenne, pour obtenir une grossesse multiple chez une femme de 37 ans et plus, le nombre de blastocystes transférés est de 1,9.

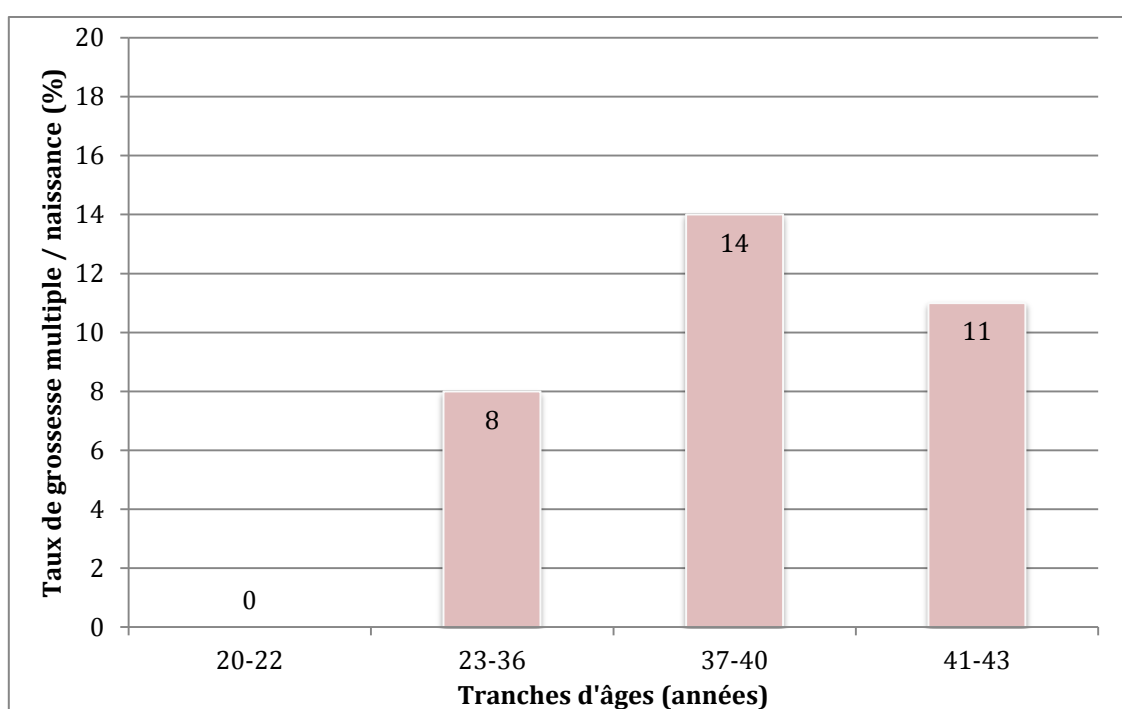


Figure 31:

Taux de grossesse multiple parmi les naissances, selon les tranches d'âges de la femme

Dans notre centre, le taux de grossesse multiple par naissance n'est pas influencé par l'âge de la femme.

G) TAUX DE NAISSANCE PAR TRANSFERT D'UN BLASTOCYSTE SELON SA MORPHOLOGIE

1) *MORPHOLOGIE DU BLASTOCYSTE ET TAUX DE NAISSANCE QUEL QUE SOIT L'ÂGE DE LA FEMME*

De façon évidente, d'après la **Figure 32** les blastocystes de morphologie « Good » sont ceux qui aboutissent le plus souvent à une naissance (38%). Les blastocystes jeunes (« Early ») et ceux de morphologie « Poor », donnent un taux de naissance vivante par ponction quasiment similaire (14 et 13% respectivement).

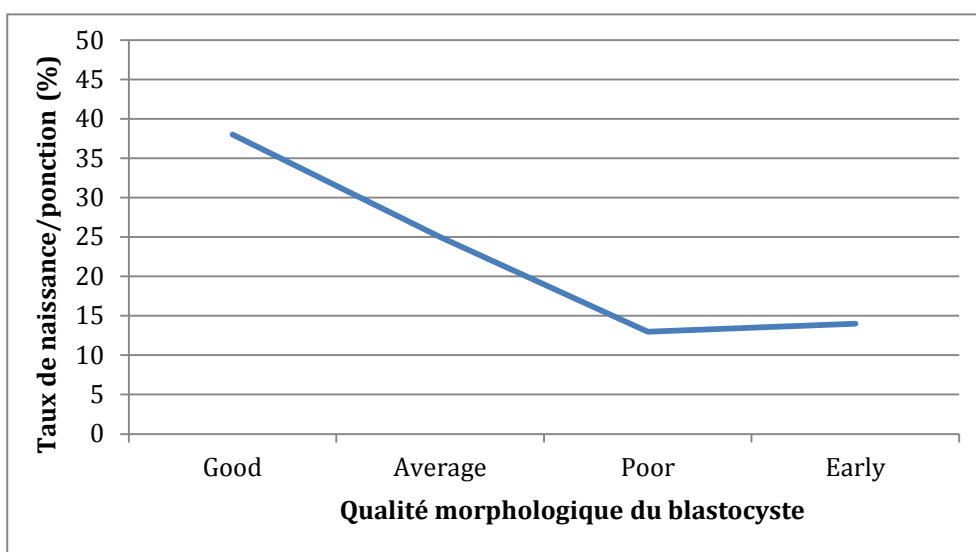


Figure 32:

Taux de naissance par ponction en fonction de l'aspect morphologique du blastocyste

2) TAUX DE NAISSANCE POUR CHAQUE TYPE DE MORPHOLOGIE EN FONCTION DE L'ÂGE

Nous avons ensuite investigué l'impact de la morphologie du blastocyste transféré sur le taux de naissance en tenant en compte de l'âge de la femme.

Afin de catégoriser les blastocystes, nous avons utilisé la classification décrite dans la section Matériel et Méthode.

Quels que soient le stade d'expansion et la morphologie du blastocyste, nous observons une diminution du taux de naissance avec l'âge. Un blastocyste dit « good » est moins performant chez une femme présentant un AMA par rapport à une femme jeune. Un blastocyste de morphologie « good », donnera 11% de naissance vivante par transfert pour une femme de [41-43 ans] alors que la probabilité d'obtenir une naissance vivante par ponction est de 42% pour une femme de [23-36 ans]. A stade morphologique identique, le taux de naissance chute avec l'âge, cela signifie qu'il existe bien un effet âge. Un blastocyste de bonne qualité s'implantera moins bien chez un AMA que chez une femme plus jeune. Cela implique probablement le taux d'aneuploïdie, décrit pour être augmenté chez les femmes présentant un AMA. L'aspect morphologique ne témoigne pas de la ploïdie (cf **Figure 33**).

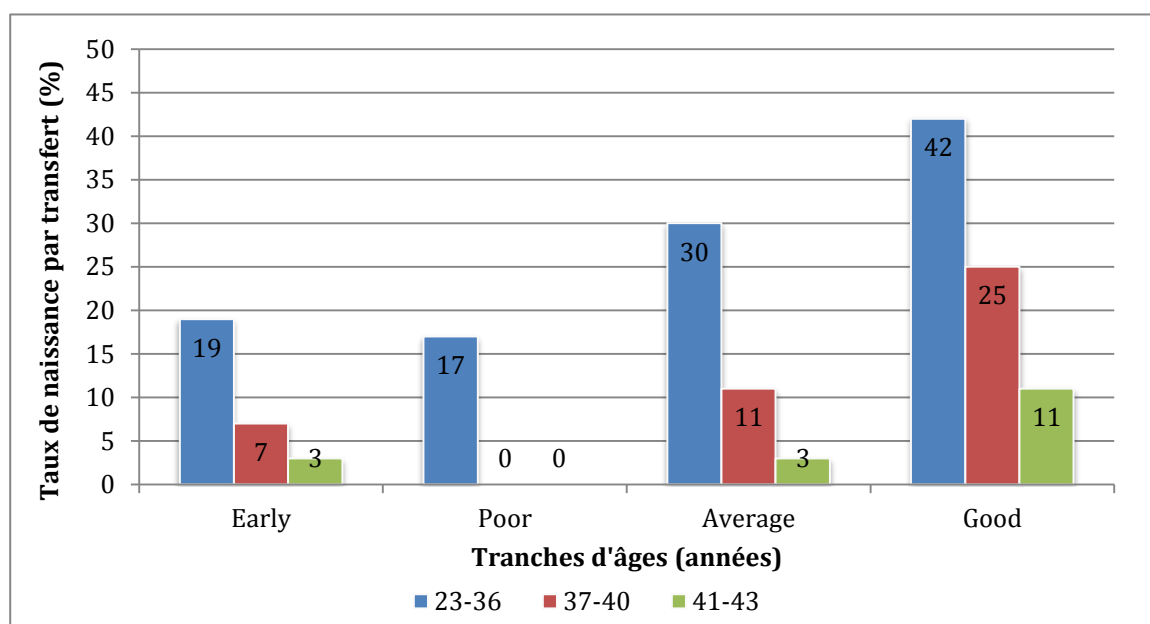


Figure 33:

Taux de naissance par transfert d'un blastocyste selon sa morphologie en fonction de tranches d'âges

Le taux de naissance par transfert d'un blastocyste selon sa morphologie dépend de l'âge de la femme. A morphologie identique, le taux de naissance vivante par transfert décline avec l'âge de la femme.

DISCUSSION

Mon travail a permis de faire un état des lieux concernant l'impact de l'âge de la femme sur le devenir biologique et clinique des embryons mis en CP. Cette étude a été réalisée en collectant les données sur une période de 9 ans (2011 à 2019) incluant ainsi 4 963 patientes, ce qui représente plus de 24 520 embryons à J2 puis 14 262 blastocystes.

L'utilité de cette thèse est de permettre **d'éclairer sur la décision à prendre concernant l'intérêt de la CP chez une femme présentant un AMA**, dans le but d'améliorer les taux d'implantation et les taux de naissance sans augmenter le taux de grossesse multiple. En effet, l'amélioration de la CP est devenue essentielle afin d'optimiser les résultats et de permettre ainsi à chaque couple d'aboutir à leur projet parental dans un délai minimal.

La CP 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 d'AMP qui a permis d'observer une augmentation du taux de blastocystes, depuis 2006, passant de 48% à environ 60% en 2019. Ainsi, la CP est devenue une pratique de routine, proposée de façon régulière aux couples pris en charge dans notre centre. Cependant, les intérêts du transfert au stade blastocyste sont contrebalancés par le risque d'absence de transfert qui représente une grande déception pour les couples pris en charge en FIV. En effet, si la CP permet de sélectionner les embryons ayant le meilleur potentiel de développement, elle 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).

Par ailleurs, en ce qui concerne la procréation, l'âge de la femme est un des facteurs les plus critiques du succès. Le terme d'Âge Maternel Avancé est régulièrement employé en AMP. En revanche il n'existe pas de définition consensuelle. En effet, certains auteurs parlent d'AMA pour les femmes à partir de 40 ans (Pantos et al, 1999), d'autres pour les femmes de 39 ans et plus (Tomazevic et al, 2007), pour d'autres dès 37 ans (Setti et al, 2013) et pour certains, une femme de 35 ans est déjà considérée comme ayant un AMA (Janny et al, 1996). Nous avons essayé au CHRU de Tours de nous faire une opinion sur cette notion d'âge seuil et d'AMA, en nous appuyant sur nos résultats.

Au final, ces derniers démontrent que l'AMP ne peut pas compenser l'ensemble des facteurs physiologiques sous-jacents à la baisse de la fertilité liée à l'âge (diminution du stock et vieillissement des ovocytes).

I – ÂGE DE LA FEMME ET DEVENIR BIOLOGIQUE EN CULTURE PROLONGÉE

A) TAUX GLOBAL DE BLASTOCYSTE

Notre étude a mis en évidence que, les femmes de [20-22 ans] et celles de [41-43 ans] présentent un taux global de blastocyste plus faible que les femmes de notre groupe de référence. En effet, le taux global de blastocyste est plus faible aux 2 extrémités d'âge de prise en charge (48% pour les femmes de [20-22 ans] et [40-43 ans] versus 59% pour les femmes de [23-36 ans]). Pour rappel, dans notre centre nous travaillons en culture prolongée avec un milieu séquentiel ou unique.

Cette observation a aussi été relevée par quelques articles déjà anciens. En 1999, Pantos retrouvait des résultats concordants avec les nôtres sur son étude réalisée sur 293 patientes, en culture avec milieu séquentiel, montrant que les femmes de 40 ans et plus, ont significativement moins de chance d'obtenir un blastocyste que les femmes de moins de 40 ans (22,2 contre 40,5%) (Pantos et al, 1999). De même, une autre étude étudiant 397 cycles de FIV avec culture en milieu séquentiel et comparant le taux de blastocyste chez des femmes âgées de moins de 39 ans avec celles de 39 ans et plus a aussi montré un taux de blastocyste significativement moins élevé chez les femmes de plus de 39 ans (29 contre 55%, $p < 0,001$) (Tomazevic et al, 2007). Une étude réalisée sur 529 patientes présentant au moins un zygote à J1, a montré qu'une augmentation de 5 ans de l'âge des femmes diminuait significativement le taux de blastocyste (Thomas et al, 2009). Chez les femmes les plus âgées, il a été répertorié uniquement une tendance à une fréquence accrue à l'arrêt de développement des embryons par rapport aux femmes les plus jeunes (Warshaviak et al, 2019). Un pourcentage plus élevé d'embryons de femmes de 42 ans et plus arrêtent leur développement à 4-7 cellules. En conséquence, moins d'embryons atteignent le stade 8 cellules contrairement aux femmes de moins de 38 ans (66% contre 72%, respectivement). Une explication possible est que l'activation du génome de l'embryon commence au stade de 4-8 cellules (Alfarawati et al, 2011), cela pourrait, en partie, expliquer le taux de blastocyste plus faible chez les femmes présentant un AMA.

Franasiak et son équipe, dans une étude regroupant 2 701 femmes ont réalisé 15 169 biopsies de blastocystes à J5 afin d'effectuer une analyse des chromosomes (CCS-Comprehensive Chromosome Screening) (Franasiak et al, 2014). Ils ont mis en évidence que, le taux d'aneuploïdie augmente de façon prévisible après 30 ans. Le taux d'embryons aneuploïdes le plus faible (20-27%) est retrouvé chez les femmes de 26 à 30 ans (**cf Figure 34**). Puis ce taux augmente progressivement pour atteindre 85% chez les femmes de 43 ans et plus. Étonnamment, une légère augmentation de la prévalence a été constatée chez les femmes de 22-23 ans avec une aneuploïdie supérieur à 40%. Cela pourrait expliquer le taux de blastocyste plus faible retrouvé dans notre étude sur des femmes jeunes. De plus il démontre que chez les femmes jeunes, l'aneuploïdie la plus retrouvée chez les embryons est la monosomie, alors que chez les femmes plus âgées, c'est une trisomie.

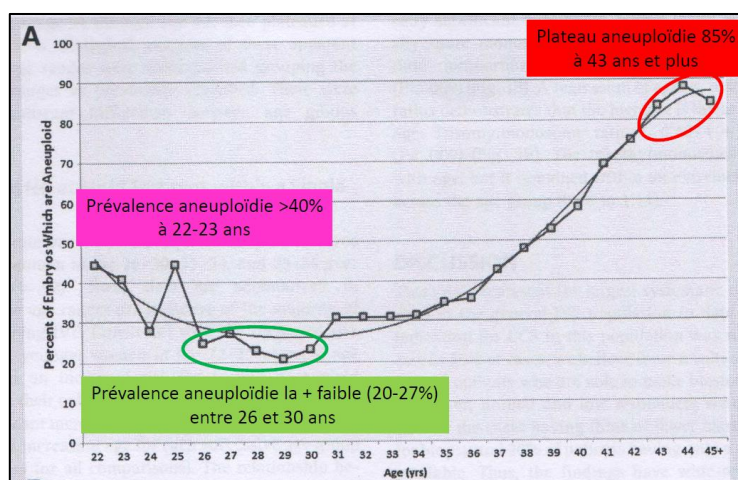


Figure 34:
Pourcentage d'aneuploïdie en fonction de l'âge de la femme
 Source: Franasiak et al, 2014

D'après Dang et son équipe, le coefficient de corrélation entre l'âge de la femme et les anomalies chromosomiques est positif, ce qui signifie que plus la femme est âgée, plus l'embryon a de risques de présenter des anomalies chromosomiques (Dang et al, 2019). Si l'âge de la femme augmente d'une unité, alors l'incidence du nombre d'anomalies chromosomiques augmente de 0,01 unité. Quel que soit l'âge de la femme, le « top 3 » des chromosomes présentant le taux d'aneuploïdie le plus élevé sont, les chromosomes 22, 16 et 21 (6,06%, 5,54% et 4,15% respectivement). Les chromosomes les plus affectés par l'âge sont les chromosomes 14 (risque multiplié par 3,7 pour une femme de plus de 37 ans par rapport à une femme jeune), 7 (x3,3) et 18 (x2,9). Une autre étude confirme l'effet négatif de l'âge de la femme sur la ploïdie des embryons dans les cycles de FIV/ICSI (La Marca et al, 2017). Dans cette étude, la probabilité d'avoir au moins un blastocyste euploïde dépend de l'âge de la femme, de l'AMH sérique et du nombre d'ovocytes matures. Le taux d'aneuploïdie serait particulièrement élevé chez les femmes présentant un AMA (femmes de 37 ans et plus), allant de 40,4 à 64,0%, selon le nombre de chromosomes étudiés (Setti et al, 2013).

En conclusion, il est évident qu'il existe un déclin progressif du taux de développement en blastocyste chez une femme avec un AMA. Nous pouvons toutefois relever le progrès observé en 20 ans concernant le taux de blastocyste. Il était de 40%, environ chez les femmes de moins de 40 ans en 1999 (Pantos et al, 1999) passant à 60%, environ chez les femmes de [23-37ans], en 2019 selon notre étude. Cela est probablement dû à l'évolution de la CP, des milieux de culture et des conditions de culture optimales.

La plupart des auteurs en viennent alors à cette même finalité: il existe une diminution du taux de blastocyste avec l'âge. Notre étude, comptant un effectif important (4 963 patientes dont 258 patientes de 41 ans et plus), le confirme. L'aneuploïdie pourrait expliquer le taux de blastocyste plus faible chez les femmes de [20-23 ans] et celles de [41-43 ans] retrouvé dans notre étude.

B) INFLUENCE DU NOMBRE D'OVOCYTES RECUEILLIS A LA PONCTION OVARIENNE

Chez les femmes présentant un AMA, il y a une diminution du nombre d'ovocytes recueillis (Shapiro et al, 2002). Ainsi, les caractéristiques générales de nos populations par tranches d'âges montrent bien que le nombre d'ovocytes recueillis à la ponction ovarienne diminue avec l'âge ($12,3 \pm 6,6$ entre [20-23 ans] vs $8 \pm 3,9$ ovocytes recueillis entre [40-43 ans]).

Nos résultats viennent confirmer ceux de l'étude de Shapiro, où il est observé une pente de régression qui indique que pour chaque tranche d'âge supplémentaire de 2 ans, le nombre moyen d'ovocytes prélevés est réduit d'une unité (Shapiro et al, 2002). Il existe ainsi une réduction progressive de la production d'ovocytes au cours du vieillissement après une hyperstimulation ovarienne, avec une diminution significative après 35 ans (Janny et al, 1996). Une étude a mis en évidence que les ovocytes prélevés chez des femmes de plus de 35 ans sont souvent de moins bonne qualité que ceux de femmes plus jeunes (Korkmaz et al, 2015). La qualité de 213 ovocytes de 54 femmes âgées de plus de 35 ans a été évaluée à l'aide d'un microscope à polarisation non invasive (PolScope). Il a été retrouvé alors que pour des femmes de plus de 35 ans, la longueur du fuseau méiotique peut être utile pour la sélection d'ovocytes de haute qualité avec un haut potentiel de développement embryonnaire. Une autre étude confirme que le vieillissement des ovocytes est caractérisé par une séquence de processus moléculaires et cellulaires qui se détériorent au cours du vieillissement (Miao et al, 2009). A ce jour il n'existe pas de marqueur fiable de la qualité ovocytaire. Cette moins bonne qualité des ovocytes chez les femmes à partir de 39 ans peut se traduire par un taux plus faible de développement des blastocystes et un taux de grossesse plus faible par transfert de blastocystes (Tomazevic et al, 2007). Dans une étude, parmi 5 516 embryons évalués, 2 920 (52,9%) ont atteint le stade de blastocyste (Ferreira et al, 2013). Le degré d'expansion des blastocystes est diminué par la présence d'agrégats dans le réticulum endoplasmique lisse, d'un grand espace périvitellin et d'anomalies de forme de l'ovocyte. Ainsi, l'identification individuelle des dysmorphismes ovocytaires pourrait être un outil de pronostic pour le développement et la qualité des blastocystes. Il a été estimé que pour les femmes de 35-37 ans, 38-40 ans, 41-42 ans et de plus de 42 ans, il faudrait collecter 5, 7, 10 et 20 ovocytes respectivement pour obtenir au moins un embryon euploïde (Vaiarelli et al, 2018).

En conclusion, nous avons démontré que, quel que soit l'âge de la femme, le nombre d'ovocytes recueillis à la ponction n'influence ni le taux d'embryon de « top qualité » à J2, ni le taux global de blastocyste. Si le taux de blastocyste diminue avec l'âge de la femme, cela signifie que la qualité ovocytaire et non la quantité influence la capacité de développement.

C) INFLUENCE DE L'ASPECT MORPHOLOGIQUE DES EMBRYONS MIS EN CULTURE PROLONGEE A J2

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. Le nombre de TQE à J2 est un indicateur de la qualité morphologique de la cohorte embryonnaire.

Le nombre de blastomères influence la capacité de développement *in vitro* de l'embryon jusqu'au stade blastocyste. En effet, un travail de thèse réalisée dans notre centre en 2017 a démontré que le taux de blastocyste est plus élevé 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) (Charlotte Mauroy, 2017). Ces résultats viennent confirmer une autre CP, que les embryons possédant 4 blastomères avaient un taux de blastocyste plus élevé que les embryons à 5 blastomères et plus qui eux-mêmes avaient un taux de blastocyste plus élevé que les embryons possédant 2 ou 3 blastomères à J2 (Sjöblom et al, 2006).

Une étude réalisée dans notre centre a démontré que les embryons présentant des blastomères avec un aspect régulier à J2 ont plus de chance de se développer jusqu'au stade blastocyste ainsi que de présenter un aspect « top qualité » au stade blastocyste (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 blastocyste dans ce contexte.

L'augmentation du degré de fragmentation des embryons précoces (J2/J3) a un impact négatif direct sur le développement des embryons jusqu'au stade blastocyste. Cet effet de la fragmentation de l'embryon est indépendant de l'âge de la femme et pourrait être un indice important de la viabilité de l'embryon dans un milieu de culture prolongé (Wu et al, 2011). Ces résultats viennent confirmer ceux de l'étude réalisée dans notre centre en 2007 sur 4 042 embryons mis en CP 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 blastocyste était significativement diminué lorsque le taux de fragmentation était important à J2 (Alikani et al, 2000 ; Hardy et al, 2003).

En conclusion, d'après nos résultats pour la majorité des classes d'âges analysées, le nombre de TQE disponible à J2 influence le taux de blastocyste. La morphologie des embryons à J2/J3 prédirait les compétences de développement jusqu'au stade blastocyste (Braga et al, 2014).

D) CINÉTIQUE DES BLASTOCYSTES OBTENUS

Dans le cadre d'un laboratoire de FIV, l'évaluation des embryons par des critères morphologiques à des moments distincts (évaluation statique) est toujours considérée comme l'outil non invasif le plus utile pour sélectionner les embryons ayant le meilleur potentiel d'implantation (Sela et al, 2012). Cependant, sa capacité à saisir le processus dynamique continu du développement embryonnaire est limitée. Dans la recherche de nouveaux paramètres, l'analyse microscopique à intervalles de temps réguliers et rapprochés (time lapse) offre la possibilité d'optimiser la sélection des embryons sur la base de l'évaluation cinétique. Cela pourrait améliorer encore la sélection des embryons viables. 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 améliorerait significativement le taux d'implantation par rapport au transfert d'un blastocyste à J6 (Kovacic et al, 2004 ; Barrenetxea et al, 2005).

Dans notre centre, nous utilisons majoritairement l'évaluation de la morphologie de manière statique. D'après nos analyses, l'âge de la femme n'influence pas la cinétique d'obtention des blastocystes quand celle-ci est appréciée sous forme de jour d'obtention du blastocyste (J5 vs J6). Pour toutes les tranches d'âges, la proportion de blastocystes obtenus à J5 est voisine de 70%.

En accord avec nos résultats, d'après une étude comprenant 122 patientes, en comparant la cinétique de développement des embryons chez les femmes âgées de 42 ans et plus avec celles de moins de 38 ans, il n'a pas été reporté de différence sur les temps de clivage (Warshaviak et al, 2019). Dans l'étude de Pantos de 1999, il n'y a pas de différence significative sur le taux de blastocyste à J5 en fonction de l'âge de la femme (33% pour les femmes de moins de 40 ans et 29% chez les femmes de 40 ans et plus) (Pantos et al, 1999). Dans une étude récente de 2019, comparant 785 patientes, il est démontré que parmi une sélection de blastocystes euploïdes, la proportion de blastocystes obtenus à J5 est significativement la même, quel que soit l'âge de la femme (42,9% à 53,9%) (Irani et al, 2019).

Warshaviak et son équipe se sont intéressés à l'utilisation du time lapse chez les femmes âgées de 42 ans et plus (Warshaviak et al, 2019). La microscopie à intervalle de temps a été utilisée pour comparer les variables morphocinétiques entre 495 embryons de femmes AMA âgées de 42 ans et plus avec 653 embryons de jeunes patientes (<38 ans). Aucune différence significative n'a été observée dans les temps de clivage entre les embryons d'AMA et les embryons témoins. Ces résultats sont en accord avec une étude qui a étudié divers facteurs influençant la morphocinétique de l'embryon (Gryshchenko et al, 2014). Cette étude a démontré que l'âge n'avait pas d'effet significatif sur les paramètres cinétiques des 3 premiers jours de développement de l'embryon. Toutefois, dans l'étude de Akarsu, incluant 197 patientes, il a été observé des retards significatifs limités liés à l'âge dans un certain nombre de variables cinétiques (tPNf, t2, t3 et t4) des embryons produits par des femmes âgées de 30 à 40 ans par rapport aux femmes plus jeunes âgées de 20 à 30 ans (Akarsu et al, 2017).

De manière générale, que ce soit par analyse morphologique statique ou dynamique, les auteurs affirment que l'âge de la femme n'impacte pas sur le temps de clivage. Nous retrouvons les mêmes résultats que la plupart de ces études alors qu'elles présentent des échantillons de taille limitée, contrairement à notre étude incluant un effectif important.

E) MORPHOLOGIE DES BLASTOCYSTES OBTENUS

1) STADE D'EXPANSION

D'après nos résultats, pour les femmes de notre groupe de référence [23-36 ans] la probabilité d'obtenir un blastocyste expansé (B4, B5 ou B6) à J5 est de 43% contre 37% chez les femmes de [37-40 ans] et 29% pour les femmes de [41-43 ans]. La même observation est faite pour les blastocystes obtenus à J6.

Des études ont mis en avant que le taux de succès après transfert à J5 ou à J6 était aussi associé au degré d'expansion du blastocyste (Gardner et al, 2000; Shapiro et al, 2001; Poulsen et al, 2017). D'après un travail de thèse réalisé dans notre centre, il a été observé qu'en cas de transfert unique chez les femmes âgées de moins de 37 ans, 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'effectue 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) (Charlotte Mauroy, 2017). Par contre, 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). Dans une étude ancienne comprenant 289 cycles de FIV, il a été observé qu'avec l'âge, les femmes ont moins de probabilité d'obtenir un blastocyste expansé (70,5% chez les femmes de 29 ans et moins versus 40,8% chez les femmes de 40 ans et plus) (Janny et al, 1996). Dans une autre étude incluant 420 patientes il a été trouvé une corrélation négative entre le degré d'expansion des blastocystes et les femmes présentant un AMA (Braga et al, 2012). Par ailleurs, une étude qui a porté sur 300 patientes âgées de 18 à 45 ans a montré que la proportion d'embryons ayant atteint une expansion complète diminue avec l'âge de la femme (Shapiro et al, 2002). D'après Minasi, les blastocystes B5-B6 ont 40% de moins de probabilité d'être aneuploïde comparé à un stade B1-B2 (Minasi et al, 2016). Ainsi, d'un point de vue cinétique, les blastocystes euploïdes se forment, atteignent le stade d'expansion puis d'éclosion de manière significativement plus rapide que les blastocystes aneuploïdes. L'association entre la morphologie des blastocystes et l'aneuploïdie explique le potentiel d'implantation plus élevé des blastocystes de bonne qualité morphologique signalés lors des cycles de FIV conventionnels (Capalbo et al, 2014).

2) ORGANISATION DES CELLULES

D'après notre étude, à J5, l'organisation des cellules du trophectoderme et de la masse cellulaire interne n'est pas affectée par l'âge de la femme. La probabilité d'obtenir un blastocyste « good » est de 40%, environ (« range » 33-44%).

Irani et son équipe ont comparé l'organisation cellulaire de 870 blastocystes euploïdes (Irani et al, 2019). En accord avec notre étude, ils ont montré que l'organisation du trophectoderme et de la masse cellulaire interne n'est pas affectée par l'âge de la femme. En effet, la proportion de blastocystes classés « good » est de 16% chez les femmes de moins de 35 ans et de 14% chez celles de plus de 42 ans. Bien que les femmes plus âgées aient moins d'embryons euploïdes au moment du prélèvement, ils sont de morphologie comparable et se sont développés à un rythme similaire au stade du blastocyste, comme par rapport à celles des femmes plus jeunes. Dans une étude réalisant une biopsie du trophectoderme sur 1 748 blastocystes obtenus à J5, il a été décrit une plus forte probabilité d'euploïdie quand la masse cellulaire interne est grade A, par rapport à un grade B ou C. Il en est de même pour le trophectoderme (Minasi et al, 2016). Selon Fragouli et ses coauteurs, étudiant 355 embryons à J3 provenant de femmes d'une moyenne d'âge de 39,4 ans, montrent qu'à un stade précoce, la ploïdie de l'embryon n'a aucun effet sur sa morphologie (82,4% d'aneuploïdie chez des embryons J3 de bonne qualité versus 90,4% chez des embryons de mauvaise qualité) (Fragouli et al, 2014). En revanche, sur 858 blastocystes étudiés provenant de femmes avec une moyenne d'âge de 38,6 ans, il est constaté une plus grande probabilité d'euploïdie parmi les blastocystes ayant un stade d'expansion plus avancé (51% d'euploïde pour les B5-B6 versus 33% pour les blastocystes jeunes) et parmi les embryons montrant une progression plus rapide vers le stade de blastocyste. Une explication possible est que l'activation du génome de l'embryon commence au stade de quatre à huit cellules (Alfarawati et al, 2011). Cela est confirmé dans une étude où les embryons présentant des scores de combinaison morphologique favorables ont affiché des taux d'euploïdie plus élevés (Gonzales et al, 2019). En effet, plus les blastocystes étaient de bon aspect morphologiques, plus ils étaient euploïdes. D'après une étude publiée en 2016, que ce soit les femmes jeunes, ou les femmes plus âgées, le trophectoderme serait le paramètre le plus important pour évaluer les blastocystes (Bos-Mikich et al, 2016). La masse cellulaire interne jouerait aussi un rôle important sur la sélection des blastocystes dans le groupe des femmes AMA. Cependant, la morphologie des blastocystes à J5 comme aide à la décision biologique a des limites qu'il faut prendre en considération.

La relation entre la morphologie et les données de dépistage de l'aneuploïdie suggère que lorsque le PGS n'est pas disponible, la morphologie des blastocystes permet de réduire légèrement le risque de transfert d'embryons aneuploïdes (Capalbo et al, 2014). Cependant, la sélection traditionnelle basée sur la morphologie ne peut pas être utilisée comme alternative au PGS pour minimiser le risque de transfert d'embryons aneuploïdes. En outre, les paramètres couramment utilisés pour l'évaluation des blastocystes ne sont pas des indicateurs très prédictifs pour améliorer la sélection parmi les embryons euploïdes. Ainsi, à condition que le stade d'expansion soit atteint, tous les embryons de « mauvaise » morphologie et à croissance plus lente doivent être biopsiés. Parmi les variables

embryologiques évaluées (morphologie et vitesse de développement), seule la morphologie des blastocystes était prédictive des données du CCS.

En conclusion, les auteurs sont assez unanimes pour dire qu'il existe une corrélation négative entre l'âge de la femme et le degré d'expansion des blastocystes. Ils affirment que le taux d'aneuploïdie augmente avec l'âge sans pour autant modifier l'organisation des cellules.

F) DEVENIR DES BLASTOCYSTES OBTENUS: NOTION DE BLASTOCYTE UTILE

La notion de blastocyste utile illustre le devenir (l'usage) des blastocystes obtenus. Cet usage est influencé à la fois par le nombre de blastocyste de bonne qualité morphologique mais aussi par la stratégie de transfert. Dans le cadre d'une stratégie de transfert mono-embryonnaire on peut imaginer que la part de blastocyste congelée sera supérieure à celle obtenue quand le nombre de blastocystes destinés au transfert sera accru.

D'après notre étude, le taux de blastocyste dit « utile » n'est globalement pas influencé par l'âge de la femme; ce taux se situant en moyenne à 70%. Cela signifie qu'environ 30% des blastocystes sont éliminés. Toutefois, nous avons relevé que lorsque l'âge de la femme augmente, la part de blastocystes disponibles pour la congélation diminue de manière significative. Il s'agit de la situation observée pour les femmes plus âgées. Cela s'explique du fait d'un nombre accru de blastocystes privilégiés en transfert frais pour les femmes de plus de 37 ans. En conséquence, la part des blastocystes disponibles pour la congélation (s'il y en a) est réduite naturellement.

II – ÂGE DE LA FEMME ET DEVENIR CLINIQUE APRES CULTURE PROLONGÉE

A) TAUX DE TRANSFERT

Pour les couples, après toutes les étapes d'un parcours de FIV (stimulation, ponction, attente..) une absence de transfert est difficile à accepter. Cela représente une grande déception pour ces couples pris en charge en AMP. La CP expose à un risque d'augmentation d'absence de transfert. En effet, il existe un risque d'arrêt de développement embryonnaire avec absence de blastocyste obtenu à J5 et J6. Dans une étude, parmi les 151 patientes incluses, 99 d'entre elles n'ont pas eu de blastocyste (66%) (Chen et al, 2018). Ainsi la tentative n'a pas abouti à un transfert. De plus, il est important que les cliniciens rappellent aux patientes le risque d'échec de transfert de la CP (Chen et al, 2018).

1) *TAUX DE TRANSFERT GLOBAL*

D'après notre étude, le taux global de transfert de blastocyste est relativement stable (90%) pour les femmes entre 23 et 43 ans. Toutefois, chez les femmes jeunes [20-22 ans], ce taux est significativement plus faible (72%).

Nos résultats sont en désaccords avec des articles déjà anciens. Effectivement, dans l'étude de Janny, il a été observé que le taux de transfert diminue significativement lorsque l'âge augmente (89% chez les femmes de 29 ans et moins versus 71% chez celles de 40 ans et plus) (Janny et al, 1996). De la même manière, Pantos décrit une tendance ($p > 0,05$) à une diminution du taux de transfert avec l'âge (88,3% chez les femmes de moins de 40 ans et 61% chez celles de 40 ans et plus) (Pantos et al, 1999).

Cette différence de résultats peut être expliquée par l'évolution de la CP depuis une vingtaine d'années, avec une amélioration et une meilleure maîtrise des conditions de culture et l'utilisation de milieux plus adéquats pour les embryons.

2) *TAUX DE TRANSFERT EN FONCTION NOMBRE D'OVOCYTES (J0)*

En ce qui concerne la relation entre le taux de transfert et le nombre d'ovocytes recueillis à la ponction ovarienne par rapport à l'âge, nous avons observé, que quel que soit l'âge de la femme, le nombre d'ovocytes recueillis à la ponction ovarienne influence le taux de transfert. Si le nombre d'ovocytes recueillis est supérieur à 4, le taux de transfert est de 90%, environ. Nous pouvons relever que, même si 4 ovocytes ou moins sont récupérés, le taux de transfert reste élevé (80%) chez les femmes de [23-36 ans] et [37-40 ans]. Il chute seulement à 70% chez les femmes de [41-43 ans]. De manière générale, plus une femme a d'ovocytes disponibles, plus elle a de chance d'obtenir un transfert et si une femme dispose de peu d'ovocytes, sa probabilité d'obtenir un transfert reste élevé mais décroît avec l'âge.

En accord avec nos résultats Scholtes a observé que le transfert de blastocyste à J5 dépend en partie du nombre d'ovocytes recueillis (Scholtes et al, 1998). L'effet apparent de

l'âge de la femme sur la probabilité de transfert de blastocyste semble être médié par le nombre d'ovocytes recueillis. Si le nombre d'ovocytes disponibles est supérieur à 4, le taux de transfert reste stable quel que soit l'âge et si le nombre d'ovocytes est de 4 ou moins, le taux de transfert diminue à partir de 40 ans.

3) TAUX DE TRANSFERT EN FONCTION DU NOMBRE DE TQE (J3)

D'après nos résultats, quel que soit l'âge de la femme, le nombre de TQE disponible à J2 influence le taux de transfert. Effectivement, pour les femmes de notre groupe de référence [23-36 ans], si 3 TQE ou plus sont disponibles à J2 le taux de transfert est de 98% versus 88% quand 3 TQE ou moins sont obtenus. Dans notre étude, si une femme de [41-43ans] obtient au moins 3 TQE, le taux de transfert est alors de 100%.

Cette observation est confirmée dans une étude qui décrit que, si une femme âgée de 40 à 43 ans obtient au moins 3 TQE, alors le taux de transfert est supérieur à 90% (Tannus et al, 2017a).

4) STRATÉGIE DE TRANSFERT/ TAUX DE GROSSESSE CLINIQUE

Dans un travail de thèse précédent, réalisé au sein de notre centre, il a été montré que, 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 (Charlotte Mauroy, Culture embryonnaire prolongée, 2017). 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.

Les données d'une étude démontrent que, chez les femmes de moins de 35 ans, le transfert d'un seul blastocyste aboutit à des taux de grossesses cliniques similaires à celui d'un transfert de 2 blastocystes (Bos-Mikich et al, 2016). En revanche, le taux de grossesse gémellaire est augmenté lors du transfert de 2 blastocystes. La décision concernant le nombre de blastocystes à transférer peut être prise en fonction du nombre et de la qualité des blastocystes disponibles et de l'âge de la femme (Tannus et al, 2017b). Chez les femmes de 40 ans et plus, lorsqu'au moins deux blastocystes expansés et de bonne qualité morphologique sont obtenus, le transfert de deux blastocystes peut améliorer le taux de naissance par rapport à un transfert d'un seul blastocyste. Toutefois, cela peut être associé à un risque accru de naissances multiples.

En conclusion, d'après nos résultats et ceux de la littérature, le nombre d'ovocytes recueillis à la ponction et le nombre de TQE obtenus à J2 influent sur le taux de transfert, indépendamment de l'âge.

L'amélioration des conditions de CP a permis d'améliorer le taux de transfert global.

B) TAUX D'IMPLANTATION

Le taux d'implantation intègre le nombre d'embryon(s) transféré(s) et le nombre de sacs implantés. C'est un marqueur pertinent de l'efficacité d'un centre d'AMP.

D'après nos résultats, le taux d'implantation est influencé par l'âge de la femme. En effet, les femmes de notre groupe de référence [23-36 ans] ont un taux d'implantation de 45%, celles de [37-40 ans] de 33% et 19% pour les femmes de [41-43 ans].

Ces résultats confirment ceux de Pantos, qui met en évidence que des taux d'implantation moins élevés chez les patientes de plus de 40 ans (9% versus 20%) après transfert de blastocyste (Pantos et al, 1999). En revanche, l'étude de Shapiro incluant 300 patientes observe une tendance non significative à la baisse du taux d'implantation avec l'âge (Shapiro et al, 2002). Il montre que l'âge n'a pas d'influence significative sur le potentiel d'implantation d'un blastocyste.

D'après une étude incluant 870 blastocystes biopsés à J5, les embryons euploïdes des femmes plus âgées ont des taux d'implantation comparables à ceux de femmes plus jeunes (Irani et al, 2019). En conclusion, d'après cette étude, l'aneuploïdie est le principal facteur lié aux mauvais résultats constatés chez les femmes AMA. En effet, lorsque des embryons euploïdes sont sélectionnés et transférés chez des femmes plus âgées, les taux de réussite sont égaux à ceux que l'on obtient chez des jeunes femmes. Gonzales retrouve les mêmes observations dans son étude (Gonzales et al, 2019). Enfin, l'augmentation du taux d'aneuploïdie liée à l'âge est associée à une implantation réduite (Setti et al, 2013). En accord avec Setti, une étude de Harton s'intéressant au taux d'implantation après transfert d'embryons euploïdes (biopsés à J3) ou de blastocystes euploïdes (biopsés à J5) en fonction de l'âge de la femme, il est observé que, le transfert d'un embryon ou d'un blastocyste euploïde ne montre pas de différence significative sur le taux d'implantation et le taux de grossesse entre les femmes jeunes et les femmes jusqu'à 42 ans (Harton et al, 2013).

En conclusion, les auteurs ne sont pas toujours d'accord en ce qui concerne l'influence de l'âge de la femme sur le taux d'implantation. La diminution du taux d'implantation chez les femmes AMA pourrait être expliquée par un taux d'aneuploïdie plus élevé chez ces dernières.

C) TAUX DE GROSSESSE CLINIQUE PAR PONCTION

Selon les auteurs, le taux de grossesse clinique peut être exprimé par ponction ou par transfert. Le taux de grossesse clinique par transfert exclu les femmes pour lesquelles il n'y a pas eu d'ovocytes à la ponction, les échecs de fécondation, les femmes pour lesquelles il n'y a pas eu de transfert. Alors qu'à l'inverse, le taux de grossesse clinique par ponction est une analyse plus stricte, mais plus représentative de la réalité.

D'après nos résultats, le taux de grossesse clinique par ponction est globalement influencé par l'âge de la femme. En effet, des valeurs plus péjoratives sont observées aux 2 âges extrêmes de prise en charge (29% chez les femmes de [20-22 ans] et 21% chez celles de [41-43 ans]). Le nombre de grossesse clinique diminue avec l'âge malgré un nombre moyen d'embryon transféré plus élevé (1 chez les femmes de [20-22 ans] versus 1,6 chez celles de [41-43 ans]).

Une étude incluant 397 cycles, comparant des cycles naturels chez des femmes âgées de moins de 39 ans et celles âgées de 39 ans et plus a montré un taux de grossesse clinique par transfert de blastocystes plus faible (24 contre 39%) chez les femmes plus jeunes (Tomazevic et al, 2007). Pour les femmes de 40 ans et plus, le taux de grossesse clinique par transfert est plus faible que pour les femmes de moins de 40 ans (44,6% versus 21,1%) (Pantos et al, 1999).

A contrario, dans l'étude de Shapiro, il est décrit que, lorsque un blastocyste expansé est obtenu, le taux de grossesse clinique par transfert est similaire, quel que soit l'âge de la femme (Shapiro et al, 2002). Le taux de grossesse clinique par transfert ne diminue pas de manière significative avec l'âge. En effet, ce taux est supérieur à 45%, même pour les patientes âgées de 41 ans ou plus.

Pour les femmes avec un AMA et une faible réserve ovarienne ($AMH < 1,1 \text{ ng/mL}$), la CP de l'ensemble de la cohorte embryonnaire ne compromet pas l'issue de la tentative (Chen et al, 2018). Si ces patientes obtiennent un blastocyste à J5, elles auront un taux de grossesse clinique par transfert significativement plus élevé que si le transfert est réalisée à J3 (12% versus 5% respectivement).

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).

De manière générale, il est retrouvé une diminution du taux de grossesse clinique par ponction ou par transfert chez les femmes présentant un AMA.

D) TAUX DE FAUSSE COUCHE CLINIQUE PAR GROSSESSE CLINIQUE

D'après nos résultats, le taux de FCC augmente globalement significativement avec l'âge de la femme. Ce taux est de 14% chez les femmes de notre groupe de référence [23-36 ans], et passe successivement à 22 puis 26% chez les femmes de [37-40 ans] et [41-43 ans] respectivement.

Dans l'étude de Tomazevic et al, incluant 397 patientes en parcours de FIV en cycle naturel, il a été observé que, pour les femmes de plus de 39 ans, le taux de FCC était significativement plus élevé ($p < 0,05$) par rapport aux femmes plus jeunes (Tomazevic et al, 2007). Des résultats similaires sont trouvés dans une autre étude incluant 293 patientes. En effet, pour les femmes de 40 ans et plus le taux de FCC est plus élevé que pour les femmes de moins de 40 ans (25% versus 13%) (Pantos et al, 1999). Une autre étude vient confirmer ces observations, le taux de FCC et de grossesse ectopique est de 62% chez les femmes de plus de 40 ans versus 27% chez celles de 36 ans (Dew et al, 1997).

A l'inverse, l'équipe de Janny suggère qu'après transfert de blastocyste, le pourcentage de FCC n'augmente pas lorsque l'âge de la femme augmente (Janny et al, 1996). Dans cette étude, il est retrouvé un taux de FCC de 15% chez les femmes de 30-34 ans, 19% chez celles de 36-39, puis 11% chez les femmes de 40 ans et plus.

L'augmentation du taux d'aneuploïdie liée à l'âge est corrélée à un taux de FCC plus élevé (Setti et al, 2013). Selon plusieurs études, il est observé une diminution du taux de fausse couche et du taux d'échec d'implantation non négligeable chez les AMA (moyenne d'âge de 39 ans) avec l'utilisation du PGS (Capalbo et al, 2017 ; Franasiak et al, 2014 ; Ubaldi et al, 2019). Parmi des blastocystes euploïdes transférés, le taux de FCC n'est pas significativement différent (« range » 7,9%-14,3%) quel que soit l'âge de la femme (Irani et al, 2013). La même observation est retrouvée dans l'étude de Gonzales (Gonzales et al, 2019). Munne et ses collaborateurs, en biopsant des embryons à J3, ont observé que le taux de FCC diminuait de manière significative après le PGS (15 contre 33,8%, $p < 0,05$), ce qui se traduit par un taux de grossesse évolutive nettement plus élevé (15,9 contre 10,6%, $p < 0,05$) (Munne et al, 1999). Les taux de fausses couches obtenus dans cette étude sont comparables à ceux qui ont été obtenus en routine sans l'utilisation des méthodes de haute technologie de PGS ou d'évaluation morpho cinétique des embryons (Minasi et al, 2016). Les résultats suggèrent donc que l'évaluation des embryons par PGS ou l'imagerie par intervalle de temps n'améliore pas en soi la qualité des embryons ou des ovocytes et n'améliore peut-être pas les résultats de la FIV. En effet, des résultats cliniques similaires, en termes de fausse couche en cours, sont également signalés dans le cas de doubles transferts d'embryons non testés (Ubaldi et al, 2015 ; Kang et al, 2016).

La majorité des études affirme que le risque de fausse couche clinique augmente avec l'âge. Une fois encore, le taux d'aneuploïdie, reconnu comme étant plus élevé chez les femmes présentant un AMA serait en cause.

E) TAUX DE NAISSANCE PAR PONCTION

L'objectif final d'une tentative de FIV est d'obtenir la naissance d'un enfant en bonne santé.

D'après notre étude, nous observons une diminution du taux de naissance par ponction avec l'âge de la femme. Ce taux est de 32% pour les femmes de [23-36 ans], 25% pour les [37-40 ans] et 14% pour les femmes de [41-43 ans].

Au final, en cycle naturel, le taux de naissance vivante par transfert dans le groupe des femmes de 39 ans et plus était significativement plus faible par rapport au groupe des femmes de moins de 39 ans (3 contre 23 % respectivement, $p < 0,001$) (Tomazevic et al, 2007).

A l'inverse, dans l'étude de Janny, aucune différence n'est observée pour le taux naissance par transfert en fonction de l'âge de la femme (26,5% pour les femmes de 29 ans et moins versus 23,8 chez les femmes de 40 ans et plus) (Janny et al, 1996).

D'après l'étude d'Irani et de Gonzales, les embryons euploïdes des femmes plus âgées étaient associés à un taux de naissance vivante par transfert comparable à celui des femmes plus jeunes (Irani et al, 2019 ; Gonzales et al, 2019). Selon plusieurs études, comparant les femmes en parcours d'AMP avec une moyenne d'âge de 39 ans bénéficiant d'un cycle de FIV soit avec PGS, soit sans, indiquent que dans le groupe avec PGS, le taux de naissance vivante n'est pas amélioré (Capalbo et al, 2017 ; Franasiak et al, 2014 ; Ubaldi et al, 2018). *A contrario*, une récente étude démontre que le PGS permet une augmentation (54% versus 33%) du taux de naissance vivante par cycle pour les femmes avec un AMA (Lee et al, 2019).

En conclusion, nous avons observé une diminution du taux de naissance par ponction avec l'âge. Plusieurs auteurs affirment que l'utilisation du PGS ne permet pas d'augmenter le taux de naissance chez les femmes présentant un AMA.

F) TAUX DE GROSSESSE MULTIPLE PAR NAISSANCE

Il est rapporté depuis le début de la FIV que le taux de grossesse multiple est bien supérieur au cours des cycles obtenus par FIV que lors de grossesses naturelles hors AMP. En 2016, en France, le taux d'accouchement gémellaire après une prise en charge en AMP était d'environ 9,4% (rapport de l'Agence de la biomédecine de 2017) contre moins de 2% en cycle spontané. C'est pourquoi il est important d'adapter la stratégie de transfert afin d'être optimum en terme de taux d'implantation et de naissance 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 al, 2003).

D'après nos résultats, le taux de grossesse multiple par naissance ne dépend pas de l'âge de la femme ($p_{\text{global}} > 0,05$) variant de 8% à 14%. Toutefois les femmes de [37-40 ans] ont une probabilité significativement augmentée d'avoir une grossesse gémellaire par rapport aux femmes du groupe de référence. 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. Pour éviter le risque de grossesse multiple, 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 peut être discutée.

Les femmes de 37 ans et plus avec transfert de 2 blastocystes obtenant une grossesse gémellaire n'ont pas de profil particulier par rapport à un transfert de 2 blastocystes permettant une grossesse unique (pas de différence significative sur le nombre d'ovocytes recueillis, sur le nombre d'embryon obtenus à J2, sur le nombre de TQE, le nombre d'embryons congelés). Ainsi, ce n'est pas possible d'identifier les femmes AMA à risque de grossesse gémellaire.

Une étude incluant 170 femmes a montré que l'augmentation du nombre de blastocystes transférés en regard de l'âge de la femme n'améliore pas significativement le taux de grossesse clinique (28,6% de grossesse clinique chez les femmes à partir de 40 ans quand un blastocyste est transféré versus 42,9% quand 2 blastocystes sont transférés) mais augmente le taux de grossesse multiple (0% de grossesse multiple quand un blastocyste est transféré versus 32% quand 2 blastocystes sont transférés) (Alansari and Akande, 2015).

En conclusion, les auteurs sont unanimes pour affirmer que la grossesse gémellaire expose à un risque accru de morbi-mortalité maternelle, périnatale et néonatale. En revanche, le lien entre l'âge de la femme et le risque de grossesse gémellaire est discuté.

G) TAUX DE NAISSANCE PAR TRANSFERT D'UN BLASTOCYSTE SELON SA MORPHOLOGIE

Dans l'étude de Bakkensen, étudiant la morphologie de 1 023 blastocystes, il a été montré que l'expansion des blastocystes et la qualité du trophoctoderme ont chacune été associées à un taux de naissance significativement augmenté (Bakkensen et al, 2019).

Dans notre étude, nous avons observé que le taux de naissance par transfert est influencé par la morphologie du blastocyste transféré, quel que soit l'âge de la femme. Cependant, à morphologie identique, le taux de naissance diminue quand l'âge de la femme augmente. En clair, cela signifie qu'un blastocyste avec une « good » morphologie chez une femme présentant un AMA, n'aboutit pas aux mêmes résultats que dans le groupe de référence. En effet pour un blastocyste dit « good », le taux de naissance qui est de 42% chez une femme de [23-36 ans] décroît à 25% pour une femme de [37-40 ans] et enfin à 11% pour une femme de [40-43 ans].

Au final, il est évident que la morphologie du blastocyste transféré influence sur le taux de naissance. En revanche, un blastocyste de qualité morphologique identique n'aboutira pas aux mêmes résultats entre les femmes jeunes et les femmes présentant un AMA.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour des raisons diverses, de plus en plus de femmes sont confrontées à des problèmes d'infertilité liés à l'âge. Cela nécessite une prise en charge en AMP. D'autre part, la culture embryonnaire prolongée s'est largement développée depuis quelques années et a montré son efficacité en termes de taux d'implantation et de naissance vivante par ponction. Un des challenges le plus important est de prévenir les futures générations sur le déclin de la fertilité lié en partie à l'âge.

Dans une étude, Léridon dit que le message pour une femme de **moins de 35 ans** qui tente de concevoir un enfant est le suivant: « **soyez patiente** » (Leridon, 2004). Si la femme ne parvient pas à concevoir dans l'année qui suit, les chances de concevoir par la suite sont encore importantes: plus de la moitié des femmes qui n'ont toujours pas d'enfant après un an concevront au cours des deux années suivantes. Le message pour les femmes âgées de **35 ans et plus** est le suivant: « **soyez impatientes** ». Les chances d'une conception spontanée rapide sont encore réelles, mais en cas d'échec, le traitement hormonal ne compensera pas entièrement les années (et les chances de concevoir) perdues.

L'inefficacité de la FIV peut résulter de nombreux facteurs, mais il est clair que le taux d'aneuploïdie lié à l'âge est un problème majeur. L'aneuploïdie est associée à l'âge de la femme et n'est que subtilement liée à l'aspect morphologique du blastocyste. Ainsi, un pourcentage réel des embryons sélectionnés pour le transfert, même les plus "idéaux", seront aneuploïdes et n'auront qu'un potentiel reproductif faible, voire inexistant. Le PGS permet d'identifier plus rapidement le(s) blastocyste(s) euploïde(s) obtenu(s) lors de la tentative. Le blastocyste identifié comme étant euploïde, est alors transféré d'emblée, on parle alors de grossesse initiée « **sooner** ». Sans PGS, le blastocyste transféré n'est pas forcément euploïde. Si il est aneuploïde, il ne donnera pas lieu à une grossesse, il faudra alors transférer (si présence) un autre blastocyste qui aura été congelé. On parle alors de grossesse initiée « **later** ». Il faut garder à l'esprit qu'un blastocyste avec une morphologie de bonne qualité n'est pas forcément euploïde. En résumé, le PGS pourrait permettre l'obtention d'une grossesse plus rapidement grâce à la sélection de blastocystes euploïdes. A ce jour, le PGS n'est pas autorisée en France.

D'après Ubaldi, lorsque une femme avec AMA se présente pour une demande de FIV, trois options principales s'offrent à elle: **maximiser la réponse ovarienne** lors de la stimulation, **conserver ses ovocytes** (raisons médicales telle qu'une réserve ovarienne très diminuée) ou avoir recours à un **don d'ovocytes** afin de palier à l'effet de l'âge (Ubaldi et al, 2019).

Depuis l'introduction de la vitrification, le taux de survie des ovocytes a augmenté drastiquement. C'est pour cela qu'à l'heure actuelle, la vitrification des ovocytes est devenue le gold standard de la préservation de la fertilité féminine (Society for Assisted Reproductive Technology). Par ailleurs, la préservation de la fertilité sociétale (social freezing) peut être considérée comme une assurance à la reproduction contre l'âge relatif à l'infertilité (Goold I et al, 2009). Cette dernière est en passe d'être mise en place en France.

De plus, il faut garder à l'esprit, que l'âge de la femme est loin d'être le seul paramètre influençant une naissance vivante dans une tentative de FIV. En effet, dans notre étude nous ne nous sommes pas intéressés à l'impact des paramètres spermatiques. Il serait intéressant de les analyser et de regarder l'impact que le sperme pourrait avoir chez une femme présentant un AMA. D'après la littérature, une altération des paramètres spermatiques n'impacterait pas forcément la fécondation et le développement embryonnaire précoce mais serait associée à un taux de blastocyste plus faible (Janny et al, 1996). 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 CP des embryons (Braga et al, 2013).

En conclusion, **l'information du couple** devrait éclairer sur la difficulté de la procréation à un âge plus tardif et sur le fait que les techniques d'AMP, aussi performantes qu'elles soient, ne peuvent tout résoudre et notamment faire remonter le temps biologique.

ANNEXES

ARTICLE EN COURS DE SOUMISSION

Title

Effectiveness of extended embryo culture for patients with advanced maternal age?

Running title

Extended embryo culture and AMA

R.SAINTE-ROSE^{1,2}, L.DIJOLS^{1,2}, C.PETIT^{1,2}, C.FRAPSAUCE^{1,2}, F.GUERIF^{1,2,3,4,*}

¹ Service de Médecine et Biologie de la Reproduction CHRU de Tours F-37044 Tours France, ² Université François Rabelais de Tours F-37041 Tours France,

³ INRA, UMR85 PRC F-37380 Nouzilly France,

⁴ CNRS, UMR6175 PRC F-37380 Nouzilly France.

* To whom correspondence should be addressed at: Service de Médecine et Biologie de la Reproduction, 2 boulevard Tonnelle, 37000 Tours, France. E mail: guerif@med.univ-tours.fr

Abstract

STUDY QUESTION: What is the effectiveness of extended embryo culture for women with Advanced Maternal Age (AMA)?

SUMMARY ANSWER: Whatever the morphological characteristics of blastocyst transferred, in AMA patients implantation rates remain always lower in comparison with a reference group.

WHAT IS KNOWN ALREADY: AMA patients are associated with lower implantation rates in IVF. Extended embryo culture has proven its efficiency to improve embryo selection as well as further implantation in comparison with early transfers.

STUDY DESIGN, SIZE, DURATION: Twenty four thousand and five hundred and twenty day 2 embryos from 4963 couples were cultured until the blastocyst stage. Women were categorized in different groups focusing on AMA patients (≥ 37 years). A retrospective analysis of blastocyst development, kinetics, morphology, implantation and live birth rate was conducted in such groups of women.

PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS: D2 Embryos obtained from AMA or younger patients were cultured until D5/D6 for transfer and/or cryopreservation. At the blastocyst stage, a morphological description was performed according to Gardner's classification. Four groups ("early", "good", "average" and "poor") were defined according to the stage of expansion and the organization of the cells. Implantation, clinical pregnancies, miscarriages and live birth rate were recorded. Biological and clinical results were analysed in AMA patients in comparison with younger women.

MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE: In AMA patients, the blastocyst rate was significantly decreased compared to younger women ($p < 0.0001$). On D5, blastocysts undergo growth retardation in AMA patients highlighted by a decreased rate of full/expanded blastocysts ($p < 0.05$). However, the organization of the cells in trophoderm as well as in the inner cell mass remained unchanged ($p > 0.05$). As expected, in AMA

patients, the number of blastocysts useful for cryopreservation was decreased ($p<0.05$). Additionally, after blastocyst transfer, AMA patients remained exposed to a reduced rate of implantation rate ($p<0.05$), clinical pregnancy rate ($p<0.05$) and live birth rate ($p<0.05$) compared to younger women. It is important to note that in AMA patients or younger women, the transfer of a blastocyst with similar morphological characteristics will not result in the same live birth rate ($p<0.05$).

LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION: This study was conducted in a single center.

WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS: Despite embryo selection allowed by extended embryo culture, our results confirm that such culture cannot compensate for the effect of maternal age. The couple's information needs to highlight on the real chances of success as a function of the age of the woman, specifically for AMA patients.

STUDY FUNDING/COMPETING INTEREST(S): The authors have no conflicts of interest to disclose. No external funding was obtained for this study.

TRIAL REGISTRATION NUMBER: N/A

Keywords: advanced maternal age, blastocyst, extended embryo culture, implantation, morphology

Introduction

Social trends around the world have led women to delay their parenthood project into their 30s and, in some cases, their 40s. In France, the average age of women giving birth has increased from 28.8 to 30.8 years over the last 20 years (INSEE, 2020). Maternal age is the most critical parameter determining the likelihood of conception either naturally or following In Vitro Fertilization (IVF) (Irani *et al.*, 2018). In humans, age-related decline in female fertility is a well-known physiological phenomenon: (Janny *et al.*, 1996; Khoshnood *et al.*, 2008). Thus, the ageing of women is accompanied by a reduced ovarian function (Lie Fong *et al.*, 2012), a lower oocyte quality (Miao *et al.*, 2009) and an increased rate of aneuploid embryos (Franasiak *et al.*, 2014), leading to an extended rate of miscarriages (Wilcox *et al.*, 2019) and finally to a poor rate of clinical pregnancies as well as live births (Tomazevic *et al.*, 2007).

Hence, many Advanced Maternal Age (AMA) patients turn to IVF with the hope to identify embryos with high implantation potential. Embryo quality has always been considered as an important predictor of successful implantation (Zhylkova *et al.*, 2019). It has been highlighted that culture of early embryos to the blastocyst stage was the best way to select useful blastocysts for transfer or cryopreservation (Gardner *et al.*, 1999; Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE, 2011), with higher likelihoods of implantation after blastocyst transfer in comparison with early cleaved embryos (Guerif *et al.*, 2007). Considering that not all cleavage stage embryos will be able to reach the blastocyst stage, it should be kept in mind that there is always a possibility that a patient may have no blastocyst for transfer (Perloe *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2018). Thereafter, blastocyst outcome (transfer, freezing, discarding) is based on morphological parameters. Possibly, the most widely used blastocyst scoring system is the one proposed by Gardner and Schoolcraft (Gardner and Schoolcraft., 1999) taking into account three parameters (blastocyst stage

expansion as well as ICM and TE organization). Not surprisingly, higher implantation is observed with top graded blastocysts (Guerif *et al.*, 2010; Dang *et al.*, 2019).

In AMA patients, the rate of aneuploidy ranges from 40% to 64%, depending on the number of chromosomes studied (Setti *et al.*, 2013; Franasiak *et al.*, 2014). Yet, the extent of aneuploidy is lower in blastocysts in comparison with early human embryos (Fragouli *et al.*, 2008). While, chromosomal abnormalities can still be only identified by Preimplantation Genetic Screening (PGS) for aneuploidies, however such promising technology is not used routinely by all IVF centres all over the world (Gonzales *et al.*, 2019). In such conditions, it could be expected that extended embryo culture to the blastocyst stage could be a useful tool to select the best embryos in AMA patients. However, AMA patients have a highest probability to have reduced oocyte than early embryos number available for extended embryo culture. Some authors have shown that there was an increased risk of transfer cancellation when the number of oocytes and early embryos was small (Scholtes *et al.*, 1998; Tannus *et al.*, 2017). Only a few articles have studied the impact of a women's age on the development of the blastocyst (Janny and Menezo, 1996; Scholtes *et al.*, 1998; Pantos *et al.*, 1999; Tomazevic *et al.*, 2007; Tannus *et al.*, 2017). Most of these articles have included low numbers of early embryos in extended embryo culture.

Consequently, the aims of this study were to determine how biological and clinical outcomes after extended embryo culture are related to woman's age with a specific attention to AMA patients. The points of measurement were the following (i) biological outcome including the overall rate of blastocyst development, kinetics and morphology of blastocysts developed, (ii) clinical outcome including rate of transfer and blastocyst useful, implantation, clinical and live birth rates, (iii) live birth rate when blastocyst morphology and woman's age were combined.

Material and Methods

Study design

A retrospective study was undertaken in the IVF unit, Bretonneau University Hospital, Tours, France, between January 2011 and December 2019. Over these nine years, we have collected all IVF attempts (including conventional IVF and ICSI) while excluding oocyte donation and ICSI with testicular extractions.

This led to the collection of data from 4 963 patients, representing 24 520 embryos at D2 and 14 262 blastocysts developed at D5 and D6. In our study, the average age of the women was 33.1 ± 4.5 years.

Our issue was the impact of women's age on extended embryo culture. Following the analysis of individual age data, we were able to group some female ages and thus analyze 4 age groups, distributed as follows; [20-22], [23-36], [37-40], [41-43] years. This allowed us to identify a reference group: women between 23 and 36 years of age. AMA patients included 2 age groups: [37-40 years] and [41-43 years].

The main outcomes were the blastocyst rate and the clinical outcome, including implantation rate and live birth rate.

In Vitro Fertilization procedure

The ovarian stimulation protocol and the IVF and ICSI procedures used have already been described elsewhere (Guerif *et al.*, 2004). Briefly, embryo culture with sequential media and assessment were carried out as follows: fertilisation (day 0) was performed in G-IVF™ (Vitrolife AB, Sweden). The following morning (day 1), the oocytes were individually placed in microdrops (25 µl) in G1™ (Vitrolife AB, Sweden) under Ovoil™ (Vitrolife AB, Sweden). From day 3 to day 5/6, embryo culture was performed in microdrops in G2™ (Vitrolife AB, Sweden) under mineral oil. All cultures took place in incubators at 37°C with 6% CO₂, 5% O₂ and 89% N₂.

Morphological assessment of embryos

All the subsequent optical assessments were performed using an inverted microscope with Hoffman modulation contrast (x200 and x400 magnification). All observations were performed by two experienced embryologists.

Embryos were evaluated 44-46 hours post-insemination/ICSI (day 2) on the basis of the number of blastomeres, shape (regularity) of cells, fragmentation rate and the presence of multinucleated blastomeres. Embryos with one or more multinucleated blastomeres were excluded from transfer and further extended embryo culture.

Assessment of blastocyst morphology

The outcome of extended embryo culture was recorded for each individually cultured embryo. The morphological assessment was based on the expansion of the blastocoel cavity (B1 to B6) and the number and cohesiveness of the inner cell mass (ICM) and trophectodermal cells (Gardner and Schoolcraft., 1999). We carried out morphological 4 groups according to the stage of expansion and the organization of the cells: "Early" (B1-B2), "Good" (B3-B6 AA/AB/BA/BB), "Average" (B3-B6 AC/CA/BC/CB) and "Poor" (B3-B6 CC). Only supernumerary blastocysts with the following characteristics were frozen on day 5/6: at less B3-B6 stages with morphology classified as "good" or "average".

Biological outcome

The blastocyst rate is the ratio between the number of blastocysts obtained at D5 or D6 and the number of embryos in extended embryo culture at D2. At D5 or D6, a blastocyst is considered as "useful" when it is used for transfer or freezing.

Transfer strategy

The transfer strategy in our IVF center takes into account two main criteria: the age of the woman and the rank of the oocytes retrieval. A single blastocyst transfer is recommended when the woman is less than 37 years old and performs her first or second

IVF attempt, a transfer of two blastocysts is recommended for all women from the 3rd oocytes retrieval and as soon as the 1st IVF attempt from the age of 37 and onwards.

Clinical outcome

Serum hCG levels were measured 7 days after blastocyst transfer. Clinical pregnancy was defined as the presence of a gestational sac with foetal heart activity on ultrasound examination 5 weeks after oocyte retrieval. The implantation rate was defined as the number of gestational sacs divided by the number of blastocyst transferred. The live birth rate by oocytes retrieval is the ratio between the number of deliveries and the number of oocytes retrieval.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statview 5.1 software (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Quantitative variables were compared using variance analysis followed by Fisher's PLSD test. Qualitative data were compared using contingency tables (χ^2 test). Differences were considered significant if p was less than 0.05.

Ethical approval

Ethical approval was not required for this study.

Results

Overall blastocyst rate

Regarding to the overall blastocyst rate, we showed that the woman's age had an impact on the overall blastocyst rate. Thus, women aged 23-36 had the highest average blastulation rate (59%, range 55-61%) (**Figure 1**). Thus, this group was referred as our reference group for the woman age and compared with 3 other defined groups. In comparison with the reference group, the blastocyst rate was significantly decreased (<50%) for the two "extreme" age groups: blastulation rate of 48% in women aged 20-22 years ($p<0.0001$) and aged 41-43 years ($p<0.0001$). By contrast, only a slightly but significant

decrease (56%) was observed in women from the [37-40 years] age group ($p<0.0001$). General characteristics and biological outcomes in four groups are described in **Table I**.

Kinetics of blastocyst development

Secondly, we considered the kinetics of blastocyst development. Among women obtaining blastocysts after extended embryo culture, the proportion of blastocysts obtained at D5 was close to 70% regardless of women's age (range 69-72%). When blastocyst kinetics is evaluated according to the day of blastocyst development (D5 vs D6) our observation did not show any influence of the age of the women. Analysis of blastocyst expansion allowed us to be more precise about blastocyst kinetics. At D5, we observed that the stage of blastocyst expansion was significantly slowed down by the age of the woman (**Figure 2**). Indeed, when the age of the woman increases, the proportion of early blastocysts (B1-B2) increases. For example, on D5, the rate of early blastocysts was significantly higher in [37-40 years] women and [> 41 years] in comparison with the reference group ([23-36 years]): (35% vs 28%, $p<0.0001$) and (41% vs 28%, $p<0.0001$), respectively. This analysis shows that the developed blastocysts from AMA patients have some growth retardation at D5 (more early blastocysts, and fewer full/expanded/hatched blastocysts).

Cell organization of D5 blastocysts

When the cell organization of D5 blastocysts was considered, there was no relationship between women's age and the organization of trophectoderm as well as inner cell mass (**Figure 3**). The rate of "good" blastocysts was similar in [37-40 years] women and [> 41 years] in comparison with the reference group ([23-36 years]): (48% vs 47%) and (49% vs 47%), respectively ($p>0.05$). This analysis shows that blastocyst morphology is not altered by women's age.

Rate of useful blastocyst

Whatever the age of women was, the rate of useful blastocyst (= transferred or cryopreserved) was similar ranging from 64 to 71% without any difference between AMA

patients and women from the reference group ($p>0.05$). However when aging, the proportion of blastocysts available for freezing significantly decreased: ($p<0.05$); Thus, the rate of cryopreservation was significantly lower in [37-40 years] women and [> 41 years] in comparison with the reference group ([23-36 years]): (45% vs 61%, $p<0.0001$) and (30% vs 61%, $p<0.0001$), respectively. Such result may be explained by the fact that in AMA patients, more blastocysts (two when possible, whatever the range of the IVF cycle is) are transferred in fresh cycles in comparison with younger women (only one for the two first IVF cycles). As a consequence in AMA patients, less blastocysts are available for freezing.

Clinical results

Clinical results are described in **Table II**. The overall blastocyst transfer rate was relatively stable (80%) regardless of the age of the women, except for the younger women (64%). Indeed, in our IVF center AMA patients have the same probability to have a blastocyst transfer in comparison with the reference group. Keeping in mind, that the mean number of transferred blastocyst was significantly higher in AMA patients ([37-40 years] and [> 41 years]); in such women, the implantation rate was significantly lower in comparison with the reference group ([23-36 years]): (33% vs 45%, $p<0.0001$) and (19% vs 45%, $p<0.0001$), respectively. It could be noticed that [37-40] women have a significant higher implantation rate compared to women aged [41-43]. In a similar way to the implantation rate, AMA patients were associated to a significant lower clinical pregnancy rate and live birth rate (LBR) per oocyte retrieval. Thus in such women ([37-40 years] and [> 41 years]), the LBR was significantly lower in comparison with the reference group ([23-36 years]): (25% vs 32%, $p<0.0001$) and (14% vs 32%, $p<0.0001$), respectively. It could be noticed that [37-40] women have a significant higher LBR compared to women aged [41-43]. Not surprisingly, such result was at less partly explained by a higher miscarriage rate with woman's age. This rate was less than 15% in women aged 36 and under, while reaching

more than 20% in AMA patients. Endly, in our IVF centre, the rate of multiple pregnancies was not significantly influenced by the age of the woman ($p>0.05$), ranging from 8 to 14%.

LBR by blastocyst transfer according to its morphology

The LBR by blastocyst transfer according to its morphology depends on the age of the woman (**Figure 4**). When considering full/expanded/hatched blastocysts, we observed first that in all age groups, the LBR per transfer increased with morphology. Secondly, when a given morphological stage was considered (“poor”, “average” or “good”), the LBR decreased with age. Thus in our hands, the transfer of blastocysts with "good" morphology is associated to a LBR per transfer of 11% in [41-43 years] women while it will reach 42% in [23-36 years] women. Similarly, the transfer of blastocysts with "average" morphology is associated to a LBR per transfer of 3% in [41-43 years] women while it will reach 30% in [23-36 years] women. In AMA patients ([37-40 years] and [41-43 years]), a “good” blastocyst will have a less probability to implant in comparison with an “average” blastocyst in [23-36 years] women (25% and 11% vs 30%, respectively, $p<0.0001$).

Discussion

As previous studies reported improved results after fresh blastocysts transfers, extended embryo culture until the blastocyst stage is more and more performed (Biliangady *et al.*, 2019). Moreover, with the efficacy of vitrification, frozen blastocysts are able to provide similar (or even better) success rates (Shapiro *et al.*, 2013) to those obtained after fresh transfers (Shapiro *et al.*, 2011). However, one may question whether such good results are available for all couples whatever the age of the woman is? This topic is particularly relevant in AMA patients. However, the threshold to define AMA patients remains highly variable (Janny *et al.*, 1996; Pantos *et al.*, 1999; Tomazevic *et al.*, 2007).

Many years ago, in a study including 289 IVF cycle, it has been shown that after co-culture, preimplantation development to blastocysts declined in patients above 30 years due

to an increase in embryo arrest (Janny and Menezo, 1996). Similarly in 1999, Pantos observed that women aged 40 and over have significantly less likelihood to have a blastocyst (after culture with sequential media) than women under 40 years of age (22.2 versus 40.5%, respectively, n=293) (Pantos *et al.*, 1999). Another study analysing 397 IVF cycles showed a significantly lower blastocyst rate in women over 39 years of age (29% versus 55%) after culture with sequential media (Tomazevic *et al.*, 2007). In women aged 42 years and older, fewer embryos are able to reach the 8-cell stage compared to women under 38 years of age (66% versus 72%, respectively); a higher percentage of embryos stopping at 4-7 cells. (Warshaviak *et al.*, 2019). It is well established that activation of the embryo's genome begins at the 4-8 cell stage (Braude *et al.*, 1988). The lower blastocyst rate in women with AMA could be partly explained by a lower ability of their early embryos to go through this activation. A strength of our study was based on the number of women (n=4963) included as well as the high number of D2 cultured embryos until the blastocyst stage (n=24 520). This allowed us to analyse to define a reference group aged from 23-36 years old and an AMA group ([37-40 years] + [41-43 years]) without any “a priori”. Thus, in accordance with previous studies described above, the blastocyst rate decreased slightly at 37 years old, then more drastically at 41 years old. Such observation could be at less partly explained by the fact that the rate of aneuploidy is particularly high in AMA patients, ranging from 40.4% to 64.0%, depending on the number of chromosomes studied (Setti *et al.*, 2013). Such hypothesis is also highlighted by data from blastocysts biopsies at D5 for comprehensive chromosome analysis (Franasiak *et al.*, 2014). The lowest rate of aneuploid embryos (20-27%) was found in women between 26 and 30 years of age, then increased gradually to reach 85% in women 43 years of age and older. Surprisingly, a slight increase in prevalence of aneuploidy was found in women aged 22-23 years with a rate greater than 40% (Franasiak *et al.*, 2014). This may explain the lower blastocyst rate found in our study of young women ([20-22 years]). Despite the remaining progressive decline in blastocyst development in

AMA patients, we can emphasize the progress of extended embryo culture observed in 20 years. The rate of blastocyst development was about 40% in women under 40 years of age in 1999 (Pantos *et al.*, 1999) rising to about 60% in women [23-37 years] in 2019 according to the results from our study.

Studies have suggested that the success rate after transfer at D5 or D6 is also associated with the degree of blastocyst expansion (Gardner *et al.*, 2000; Shapiro *et al.*, 2001; Poulsen *et al.*, 2017). According to our data, when the kinetics of blastocyst development is initially evaluated according to the day of blastocyst development (D5 vs D6), AMA patients have similar results compared with the reference group. In a recent 2019 study comparing 785 patients, it was shown that among a selection of euploid blastocysts, the proportion of blastocysts obtained at D5 was significantly the same regardless of the age of the woman (Irani *et al.*, 2019). However, our study also showed that the developed blastocysts from AMA patients have some growth retardation at D5 (more early blastocysts, and fewer full/expanded/hatched blastocysts). In an early study, it was observed that with age, women were less likely to have an expanded blastocyst (70.5% in women ≤ 29 years versus 41% in women ≥ 40 years) (Janny *et al.*, 1996). In addition, a study including patients aged 18 to 45 years showed that the proportion of embryos having reached full expansion decreased with the age of the woman (Shapiro *et al.*, 2002). In addition, it has been observed a higher rate of aneuploidy among early stages blastocysts in comparison with advanced blastocysts (Fragouli *et al.*, 2014; Minasi *et al.*, 2016). Such observations cannot be explained by already published data from time lapse studies focusing only on early morphokinetics variables in AMA patients. Thus in a study using time-lapse microscopy to compare early morphokinetics variables between embryos from AMA patients (≥ 42 years old) and young patients (< 38 years), no significant differences were observed in cleavage times between both groups (Warshaviak *et al.*, 2019). These results are also consistent with another study that investigated various factors influencing the morphokinetics of the embryo

(Gryshchenko *et al.*, 2014). This study demonstrated that age had no significant effect on the kinetic parameters of the first 3 days of embryo development. To our knowledge, only one study reported altered kinetic variables (tPNf, t2, t3 and t4) for embryos produced by women aged 30-40 years compared to younger women aged 20-30 years (Akarsu *et al.*, 2017).

According to our study, at D5, the organization of the cells of the trophectoderm and the inner cell mass is not affected by the age of the woman. The rate of “good” blastocysts was similar in AMA patients in comparison with our reference group. In agreement with our study, Irani and col. showed that cell organization in 870 euploid blastocysts was not affected by the age of the women (Irani *et al.*, 2019). Indeed, the proportion of blastocysts classified as "good" was 16% in women under 35 years old and 14% in those over 42 years old. Moreover it has also been shown that morphologic analysis at the blastocyst stage cannot be relied on chromosomally normal embryos (Alfarawati *et al.*, 2011). Thus, it seems that the rate of aneuploidy increases with age without altering the organization of the cells.

A well-known drawback with extended embryo culture is the lack of blastocyst for transfer due to embryo culture arrest. Thus, one may be afraid to delay embryo transfer until blastocyst stage for couples with poor prognosis. Theoretically, AMA patients belong to such group. In our study, the overall blastocyst transfer rate was relatively stable and high (90%) for women between 23 and 43 years of age. Our results disagree with some older articles. Indeed, in Janny's study, it was observed that the transfer rate decreases significantly when the maternal age increases (Janny and Menezo, 1996). Similarly, Pantos described a trend towards a decreased transfer rate with age (Pantos *et al.*, 1999). Such discrepancy may be explained by the evolution of extended culture over the last 20 years, with an improvement of culture conditions with time.

Unsurprisingly, our results showed that both implantation and LBR rate are altered by the age of the woman with poor results for AMA patients. These results are in agreement with Pantos and col. showing lower implantation rates in patients over 40 years of age

(Pantos *et al.*, 1999). In natural cycles, the LBR in women aged ≥ 39 years was significantly lower compared to women less than 39 years (Tomazevic *et al.*, 2007). As observed in our study, AMA is highly related to an increased rate of miscarriage (Pantos *et al.*, 1999; Tomazevic *et al.*, 2007; Setti *et al.*, 2013). In our study, we focused some attention on the clinical outcome according to the morphological characteristics of the blastocyst transferred. We previously published that there was a clear relationship between the morphology of blastocysts and further implantation and LBR (Guerif *et al.*, 2010). Our present results confirm such observation in all age groups including AMA patients. Moreover in such patients, a “good” blastocyst will have a less probability to implant in comparison with an “average” blastocyst in [23-36 years] women. Our result might be related to evidence of substantial genetic abnormality in apparently normal blastocysts, including monosomy and complex aneuploidy (Yang *et al.*, 2012). Moreover, from a practical point of view, the rate of useful blastocyst (= transferred or cryopreserved) was similar between AMA patients and the reference group. However, when aging, less blastocysts are available for freezing. It suggests that in terms of cumulative LBR integrating transfers from fresh and cryopreserved embryos/blastocysts, AMA patients are exposed to poor results (Luke *et al.*, 2012). Aneuploidy is the main factor related to poor outcomes in AMA patients. Indeed, when euploid embryos are selected for transfer in AMA women, the success rate is equal to those raised in younger women (Irani *et al.*, 2019). According to several studies, the rate of miscarriage and implantation failure decrease in AMA patients with the use of PGS (Franasiak *et al.*, 2014; Capalbo *et al.*, 2017; Ubaldi *et al.*, 2019). Thus, it has been observed that among transferred euploid blastocysts, the rate of miscarriage is not significantly different regardless of the age of the woman (Irani *et al.*, 2019).

In conclusion, for different reasons, more and more women are facing age-related infertility problems requiring IVF assistance. On the other hand, extended embryo culture has been widely developed in recent years with effectiveness in terms of implantation rates

and LBR. The couple's information needs to highlight on the chances of success as a function of the age of the woman, specifically for AMA patients who are associated to poor prognosis despite the use of extended embryo culture. Putting aside the particular appeal of PGS in AMA women, such couples should understand that IVF cannot counterbalance the inexorable effect of the biological clock. Keeping in mind that the age of the woman is far from being the only key parameter for success, it would be interesting to investigate the impact of sperm parameters in couples including AMA patients.

Declaration of Author's roles

R.SR. conceived the study, analysed and interpreted the data and drafted the manuscript. F.G. analysed and interpreted the data then critically revised the manuscript. C.F. analysed and interpreted the data and critically revised the manuscript. L.D and C.P analysed and interpreted the data. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Funding: No external funding was obtained for this study.

Conflict of interest: none declared.

References

Akarsu S, Gode F, Isik AZ, Celenk H, Tamer FB, Erkilinc S. Comparison of the morphokinetic parameters of embryos according to ovarian reserve in IVF cycles. *Gynecol Endocrinol* 2017. **33**:733–6.

Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Wells D. The Relationship between Blastocyst Morphology, Chromosomal Abnormality, and Embryo Gender. *Fertility and Sterility* 95, no 2. 2011. 520–24.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011; **26**(6): 1270–1283.

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

Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, Nagy ZP, Ubaldi. Correlation between Standard Blastocyst Morphology, Euploidy and Implantation: An Observational Study in Two Centers Involving 956 Screened Blastocysts. *Human Reprod* 2014; **29**, no 6, 1173 81.

Chen P, Li T, Jia L, Fang C, Liang X. Should All Embryos Be Cultured to Blastocyst for Advanced Maternal Age Women with Low Ovarian Reserve: A Single Center Retrospective Study. *Gynecological Endocrinology* 2018; **34**, no 9, 761 65.

Dang TT, Phung TM, Le H, Nguyen TBV, Nguyen TS, Nguyen TLH, Nga VT, Chu DT, Hoang VL, Nguyen DB. Preimplantation Genetic Testing of Aneuploidy by Next Generation Sequencing: Association of Maternal Age and Chromosomal Abnormalities of Blastocyst. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 2019; **7**, no 24, 4427 31.

Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Wells D. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Hum Reprod* 2014; **20**: 117–26.

Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT. The Nature of Aneuploidy with Increasing Age of the Female Partner: A Review of 15,169 Consecutive Trophectoderm Biopsies Evaluated with Comprehensive Chromosomal Screening. *Fertility and Sterility* 2014, **101**, no 3, 656-663.e1.

Gardner DK, Lane, M, Schoolcraft, WB. Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod* 2000a; **15** (Suppl.6), 9-23.

Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in- vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; **13**(12):3434-40.

Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in- vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; **13**(12):3434-40.

Gryshchenko MG, Grygorievich M, Pravdyuk AI, Parashchyuk VY. Analysis of Factors Influencing Morphokinetic Characteristics of Embryos in ART Cycles. *Gynecological Endocrinology* 2014; **30**: 6 8.

Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, et al. 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; **22**: 1973–81.

Guerif F, Lemseffer M, Leger J, Bidault R, Cadoret V, Chavez C, Gasnier O, Sausseureau MH, Royere D. Does early morphology provide additional selection power to blastocyst selection for transfer? *Reprod Biomed Online* 2010; **21**(4):510-9.

INSEE, Estimations de population et statistiques de l'état civil, 2020.

Irani M, Zaninovic N, Rosenwaks Z, Xu K. Does Maternal Age at Retrieval Influence the Implantation Potential of Euploid Blastocysts? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2019, **220**, no 4, 379.e1-379.e7.

Janny L, Menezo YJ. Maternal Age Effect on Early Human Embryonic Development and Blastocyst Formation. *Molecular Reproduction and Development*, 1996 **45**, no 1, 31-37.

Khoshnood B, Bouvier-Colle MH, Leridon H, Blondel B. Impact of advanced maternal age on fecundity and women's and children's health. *Journal De Gynecologie, Obstetrique Et Biologie De La Reproduction* 2008; **37**, no 8, 733 47.

Lie Fong S, Visser JA, Welt CK, Rijke YB, Eijkemans MJC, Broekmans FJ, Roes EM. Serum Anti-Müllerian Hormone Levels in Healthy Females: A Nomogram Ranging from

Infancy to Adulthood. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2012; **97**, no 12, 4650 55.

Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. Oocyte Aging: Cellular and Molecular Changes, Developmental Potential and Reversal Possibility. *Hum Reprod* 2009; **15**, no 5, 573 85.

Minasi MG, Colasante A, Riccio T, Ruberti A, Casciani V, Scarselli F, Spinella F, Fiorentino F, Varricchio MT, Greco E. Correlation between Aneuploidy, Standard Morphology Evaluation and Morphokinetic Development in 1730 Biopsied Blastocysts: A Consecutive Case Series Study. *Hum Reprod*, 2016, **31**, no 10, 2245 54.

Pantos K, V. Athanasiou, K. Stefanidis, D. Stavrou, T. Vaxevanoglou, et M. Chronopoulou. Influence of Advanced Age on the Blastocyst Development Rate and Pregnancy Rate in Assisted Reproductive Technology. *Fertility and Sterility* 1999; **71**, no 6, 1144 46.

Poulsen V, Ingerslev HJ, Kirkegaard K. Elective Embryo Transfers on Day 6 Reduce Implantation Compared with Transfers on Day 5. *Hum Reprod* 2017; **32**, no 6, 1238 43.

Scholtes MC, Zeilmaker GH. Blastocyst Transfer in Day-5 Embryo Transfer Depends Primarily on the Number of Oocytes Retrieved and Not on Age. *Fertility and Sterility* 1998; **69**, no 1:78 83.

Setti AS, Figueira RCS, Braga DPAF, Aoki T, Iaconelli A, Borges E. Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection Is Beneficial in Cases of Advanced Maternal Age: A Prospective Randomized Study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2013; **171**, no 2, 286 90.

Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. A Comparison of Day 5 and Day 6 Blastocyst Transfers. *Fertility and Sterility* 2001; **75**, no 6, 1126 30.

Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. Influence of Patient Age on the Growth and Transfer of Blastocyst-Stage Embryos. *Fertility and Sterility* 2002; **77**, no 4 700 705.

Tannus S, Son WY, Shavit T, Dahan MH.. Elective Single Blastocyst Transfer in Advanced Maternal Age. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2017; **34**, no 6: 741 48.

Tomazevic T, S Korosec, I Virant Klun, S Drobnic, I Verdenik. Age, Oestradiol and Blastocysts Can Predict Success in Natural Cycle IVF–Embryo Transfer. *Reproductive BioMedicine Online* 2007; **15**, no 2, 220 26.

Ubaldi FM, Cimadomo D, Vaiarelli A, Fabozzi G, Venturella R, Maggiulli R, Mazzilli R, Ferrero S, Palagiano A, Rienzi L. Advanced Maternal Age in IVF: Still a Challenge? The Present and the Future of Its Treatment. *Frontiers in Endocrinology* 2019; **10**.

Warshaviak M, Kalma Y, Carmon A, Samara N, Dviri M, Azem F, Ben-Yosef D. The Effect of Advanced Maternal Age on Embryo Morphokinetics. *Frontiers in Endocrinology* 2019; **10**.

Wilcox A, Morken N, Weinberg C, Håberg S, Magnus M. Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: prospective register based study. *The BMJ* 2019, **364**.

Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, Peck AC, Sills ES, et Salem RD. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Molecular Cytogenetics* 2012; **5**: 24.

Figure 1:

Blastocyst rate by age of woman

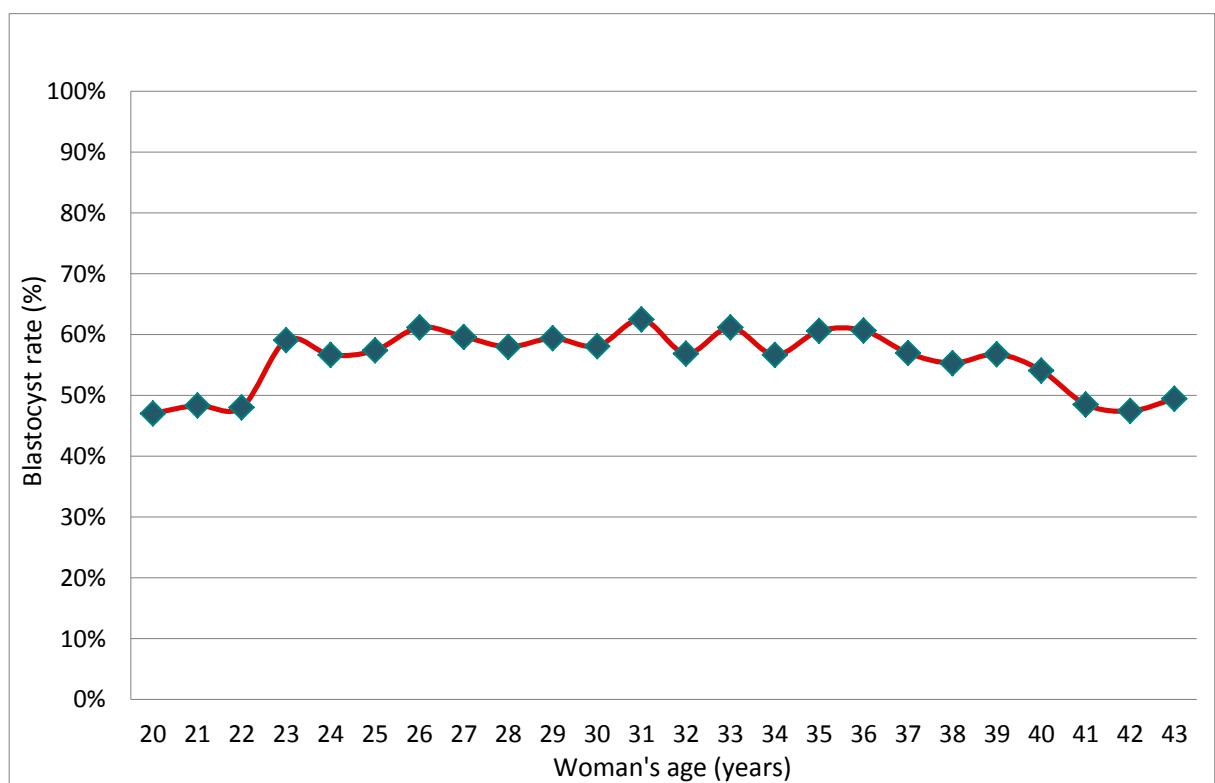
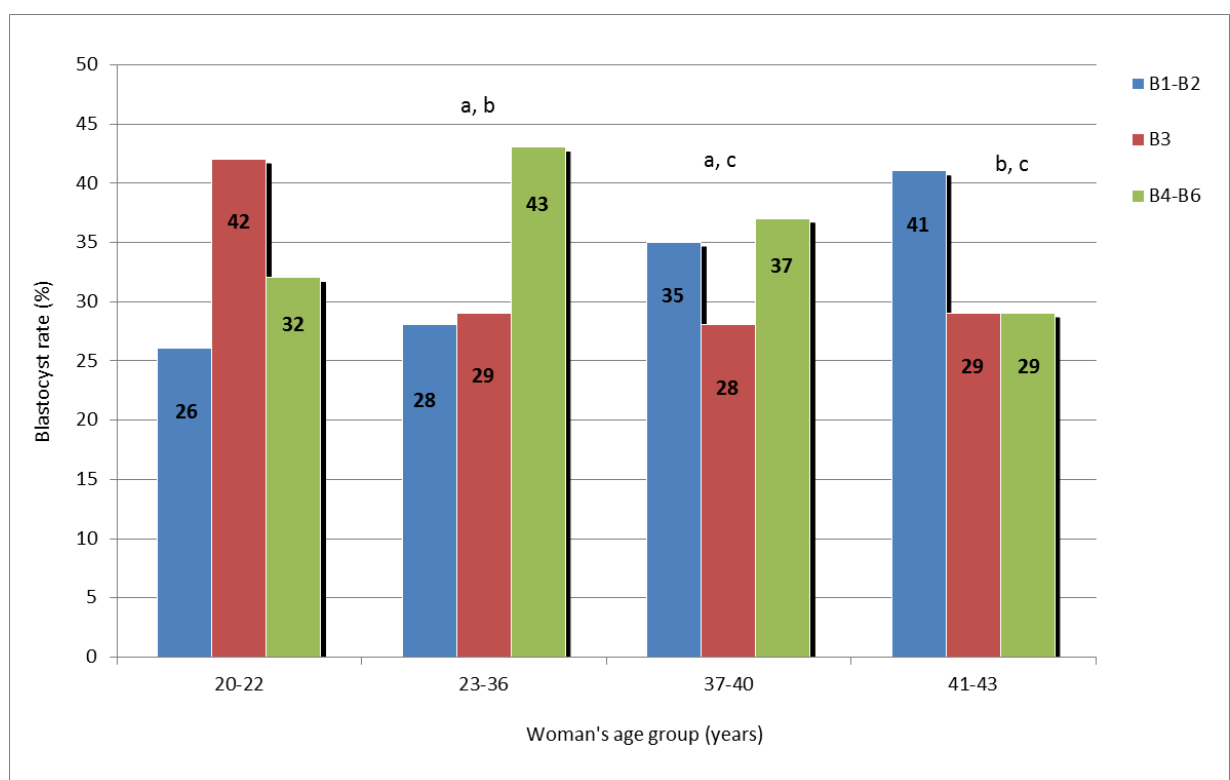


Figure 2:

Stage of blastocyst expansion obtained at D5 as a function of woman's age group



Values within rows with the same superscript are significantly different ($p < 0.05$).

Figure 3:

Morphology of blastocysts J5 according to the age of the woman

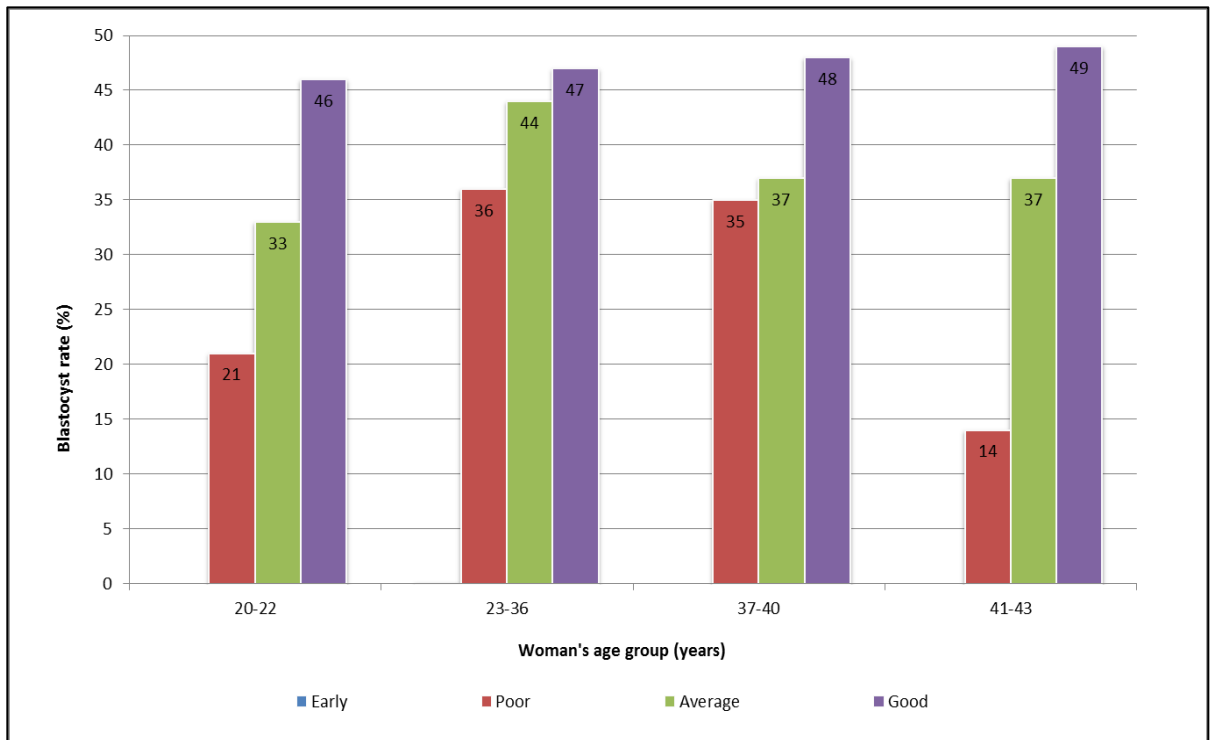


Figure 4:

Live birth rate by transfer of a blastocyst according to its morphology according to age groups

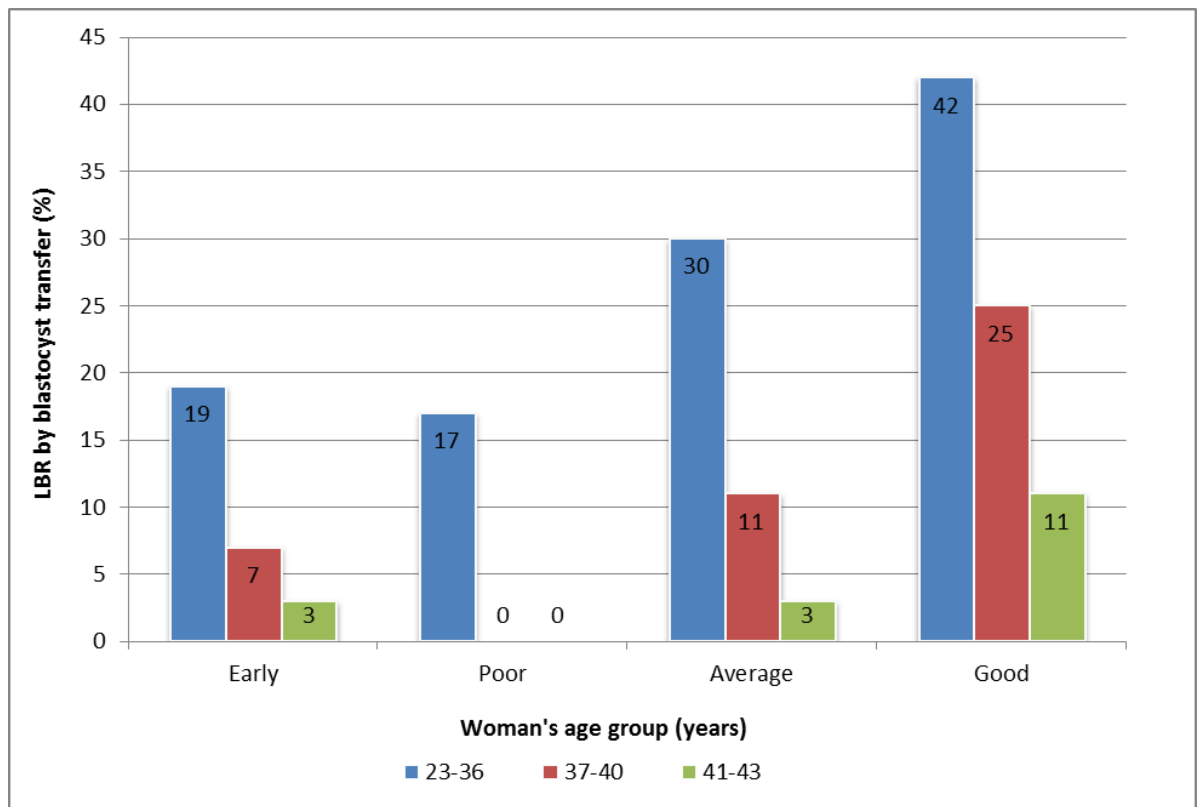


Table I:**General characteristic and biological outcomes in age groups**

		Reference			
	[20-22 ans]	[23-36 ans]	[37-40 ans]	[41-43 ans]	p
Women's age (years)	21 \pm 0.8	31 \pm 3.3	38 \pm 1.1	42 \pm 0.7	p<0.05
Number of patiente	35	3 716	954	258	
Number of embyron	219	18 940	4 336	1 025	
Number of blastocyst	105	11 235	2 425	494	
IVF technique	IVF= 14% ICSI= 86%	IVF= 39% ICSI= 61%	IVF= 39% ICSI= 61%	IVF= 43% ICSI= 57%	NS
Number of oocytes collected by oocytes retrieval	12.3 \pm 6,6	10.1 \pm 5.3	9 \pm 4.5	8 \pm 3.9	p<0.05
Total number of embryos at D2	6.9 \pm 4.9	6 \pm 3.5	5.5 \pm 3	5.1 \pm 2.9	NS
Number of TQE	1.1 \pm 1.6	1.1 \pm 1.6	1.1 \pm 1.5	0.9 \pm 1.2	NS
Number of embryos in extended culture	6.2 \pm 4.9	5.2 \pm 3.2	4.7 \pm 2.8	4.1 \pm 2.8	p<0.05
Blastocyst rate	48%	59%	56%	48%	p<0.05
Useful blastocyst rate	64%	68%	71%	71%	NS
Frozen blastocyst rate	76%	61%	45%	30%	p<0.05
Freezing of at least one blastocyst by oocytes retrieval	43%	51%	39%	27%	p<0.05

Numbers are expressed as mean \pm SD

NS = Non-Significant

TQE = Top Quality Embryo

Table II:**Clinical outcomes in age groups**

		Reference			
	[20-22 ans]	[23-36 ans]	[37-40 ans]	[41-43 ans]	p
Overall blastocyst transfer rate	64%	83,5%	83%	82%	NS
Number of blastocyst transferred	0.84 ± 0.37	1 ± 0.45	1.3 ± 0.6	1.5 ± 0.6	p<0.05
Implantation rate	38%	45%	33%	19%	p<0.05
Clinical pregnancy rate by oocytes retrieval	29%	41%	32%	21%	p<0.05
Clinical miscarriage rate per pregnancy	10%	14%	22%	26%	p<0.05
Live birth rate by oocytes retrieval	26%	32%	25%	14%	p<0.05
Multiple pregnancy rate per live birth	0%	8%	14%	11%	NS

BIBLIOGRAPHIE

Agence de la Biomédecine, Rapport médicale et scientifique, 2017.

Agence de la biomédecine, Rapport médical et scientifique, 2018.

Akarsu S, Gode F, Isik AZ, Celenk H, Tamer FB, Erkilinc S. Comparison of the morphokinetic parameters of embryos according to ovarian reserve in IVF cycles. *Gynecol Endocrinol.* (2017). 33:733–6.

Alansari L, Akande V. 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 Fertility Society Journal* 20, n° 4 (décembre 2015): 241-45.

Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Wells D. The Relationship between Blastocyst Morphology, Chromosomal Abnormality, and Embryo Gender. *Fertility and Sterility* 95, n° 2 (février 2011): 520-24.

Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage Anomalies in Early Human Embryos and Survival after Prolonged Culture In-Vitro. *Human Reproduction* 15, n° 12 (décembre 2000): 2634-43.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2011;26:1270–83.

Asch R, Simerly C, Ord T, Ord VA, Schatten G. 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.

Baart EB, Martini E, van den Berg I. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006;21:223-33.

Bacak S, Callaghan W, Dietz P, Crouse C. Pregnancy associated hospitalizations in the United States, 1999—2000. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:592—7.

Bakkensen JB, Brady P, Carusi D, Romanski P, Thomas AM, Racowsky C. Association between Blastocyst Morphology and Pregnancy and Perinatal Outcomes Following Fresh and Cryopreserved Embryo Transfer. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 36, n° 11 (novembre 2019): 2315-24.

Barrenetxea G, Delarruzea A, Ganzabal T, Jimenez R, Carbonero K, Mandiola M. Blastocyst Culture after Repeated Failure of Cleavage-Stage Embryo Transfers: A Comparison of Day 5 and Day 6 Transfers. *Fertility and Sterility* 83, n° 1 (janvier 2005): 49-53.

Baxter Bendus AE, Mayer JF, Shipley SK, Catherino WH. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertil Steril*. déc 2006;86(6):1608- 15.

Belaisch-Allart J. Mesdames, n’attendez plus (“Un enfant quand je veux : NON, un enfant quand je peux !”), *La lettre du gynécologue*, N°288, 2004, 3.

Bennett T, Kotelchuk M, Cox C, Tucker M, Da N. Pregnancy- associated hospitalizations in the United States in 1991 and 1992: A comprehensive view of maternal morbidity. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:346—54.

Blomberg M, Birch Tyrberg R, Kjølhede P. Impact of Maternal Age on Obstetric and Neonatal Outcome with Emphasis on Primiparous Adolescents and Older Women: A Swedish Medical Birth Register Study. *BMJ Open* 4, n° 11 (novembre 2014): e005840.

Bobrowski R, Bottoms S. Underappreciated risks of the elderly multipara. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1764—7.

Bomse-Helmreich O, Al Mufti W. The phenomenon of monozygosity: spontaneous zygotic splitting. In: Blickstein I, Keith LG (eds). *Multiple pregnancy. Epidemiology, gestation and perinatal outcome*. London:Taylor and Francis, 2005:94-101.

Bos-Mikich A, Michels MS, Dutra CG, Oliveira NP, Ferreira MO, Aquino DC, Frantz N. The Impact of Age on Blastocyst Scoring after Single and Double Embryo Transfers. *JBRA Assisted Reproduction* 20, n° 1 (1 mars 2016): 27-32.

Braga Paes Almeida Ferreira D, Setti AS, Figueira R, Bonassi Machado R, Iaconelli A, Borges E. Patient selection criteria for blastocyst transfers in extended embryo culture programs. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 29, n° 12 (décembre 2012): 1357-62.

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

Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, Nagy ZP, Ubaldi. Correlation between Standard Blastocyst Morphology, Euploidy and Implantation: An Observational Study in Two Centers Involving 956 Screened Blastocysts. *Human Reproduction* 29, n° 6 (1 juin 2014): 1173-81.

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

Chang HJ, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Impact of blastocyst transfer on offspring sex ratio and the monozygotic twinning rate: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2009;91:2381–90.

Chaouat G, Petitbarat M, Dubanchet S, Rahmati M, Ledée N. Tolerance to the foetal allograft? *Am. J. Reprod. Immunol.* 63, 624–36 (2010).

Chen M, Wei S, Hu J, et Quan S. Can Comprehensive Chromosome Screening Technology Improve IVF/ICSI Outcomes? A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 10, n° 10 (15 octobre 2015).

Chen P, Li T, Jia L, Fang C, Liang X. Should All Embryos Be Cultured to Blastocyst for Advanced Maternal Age Women with Low Ovarian Reserve: A Single Center Retrospective Study. *Gynecological Endocrinology* 34, n° 9 (2 septembre 2018): 761-65.

Connie C. Non-Invasive Imaging of Human Embryos before Embryonic Genome Activation Predicts Development to the Blastocyst Stage, *Nature Biotechnology* 28, n° 10 (octobre 2010): 1115- 21.

Dang TT, Phung TM, Le H, Nguyen TBV, Nguyen TS, Nguyen TLH, Nga VT, Chu DT, Hoang VL, Nguyen DB. Preimplantation Genetic Testing of Aneuploidy by Next Generation Sequencing: Association of Maternal Age and Chromosomal Abnormalities of Blastocyst. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 7, n° 24 (20 décembre 2019): 4427-31.

Dar S, Lazer T, Shah PS, Librach CL. Neonatal Outcomes among Singleton Births after Blastocyst versus Cleavage Stage Embryo Transfer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Human Reproduction Update* 20, n° 3 (juin 2014): 439-48.

De Vet A, Laven JSE, Jong FH, Themmen APN, Fauser BCJM. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril.* 2002 Feb;77(2):357.

De Vos A, Staessen C, De Rycke M, et al. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers. *Hum Reprod* 2009;24:2988-96.

Delpisheh A, Brabin L, Attia E, Brabin BJ. Pregnancy Late in Life: A Hospital-Based Study of Birth Outcomes. *Journal of Women's Health* 17, n° 6 (juillet 2008): 965-70.

Derom C, Derom R. The East Flanders prospective twin survey. In: Blickstein I, Keith LG, eds. *Multiple pregnancy. Epidemiology, gestation and perinatal outcome*. London:Taylor and Francis, 2005:39-47.

Dessolle L, Allaoua D, Fréour T, Le Vaillant C, Philippe H-J, Jean M. Monozygotic triplet pregnancies after single blastocyst transfer: two cases and literature review. *Reprod Biomed Online.* 2010;21:283–9.

Dew JE, Don RA, Hughes GJ, Johnson TC, Steigrad SJ. The Influence of Advanced Age on the Outcome of Assisted Reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 15, n° 4 (avril 1998): 210-14.

Norwit ER, Separation of conjoined twins with the twin reversed-arterialperfusion sequence after prenatal planning with three-dimensional modeling. *N. Engl. J. Med.* 343, 399–402 (2000).

Fauser BC, Devroey P, Macklon NS. Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. *The Lancet*, vol. 365, no 9473, mai 2005, p. 1807-1816.

Ferté-Delbende C, Catteau-Jonard S, Barrière P, Dewailly D. Evaluation of the ovarian reserve. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod.* 2010 Dec;39(8 Suppl 2):S27–33.

Forabosco A, Sforza C. Establishment of ovarian reserve: a quantitative morphometric study of the developing human ovary. *Fertil Steril.* 2007 Sep 1;88(3):675–83.

Forman EJ, Hong KH, Ferry KM, Tao X, Taylor D, Levy B, Treff NR, Scott RT. In Vitro Fertilization with Single Euploid Blastocyst Transfer: A Randomized Controlled Trial. *Fertility and Sterility* 100, n° 1 (juillet 2013): 100-107.e1.

Fragouli E, Wells D, Thornhill A, Serhal P, Faed MJ, Harper JC, Delhanty JD. Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Human Reproduction.* 2006; 21(9):2319-28.

Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Wells D. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Mol Hum Reprod.* 2014;20:117–26.

Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT. The Nature of Aneuploidy with Increasing Age of the Female Partner: A Review of 15,169 Consecutive Trophectoderm Biopsies Evaluated with Comprehensive Chromosomal Screening. *Fertility and Sterility* 101, n° 3 (1 mars 2014): 656-663.e1.

Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in- vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1998 Dec;13(12):3434-40.

Gardner DK, Lane, M, Schoolcraft, WB. Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum. Reprod.* 15 (Suppl.6). (2000a). 9-23.

Gardner DK, Pool TB, Lane M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. *Semin. Reprod. Med.* (2000b). 18, 205-218.

Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB. Single Blastocyst Transfer: A Prospective Randomized Trial. *Fertility and Sterility* 81, n° 3 (1 mars 2004): 551-55.

Gluck O, Mizrachi Y, Bar J, Barda G. The Impact of Advanced Maternal Age on the Outcome of Twin Pregnancies. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 297, n° 4 (2018): 891-95.

Goold I, Savulescu J. In favour of freezing eggs for non-medical reasons. *Bioethics* (2009) 23:47–58.

Grøndahl ML, Andersen CY, Bogstad J, Nielsen FC, Meinertz H, Borup R. Gene Expression Profiles of Single Human Mature Oocytes in Relation to Age. *Human Reproduction* (Oxford, England) 25, n° 4 (avril 2010): 957-68.

Gryshchenko MG, Grygorievich M, Pravdyuk AI, Parashchyuk VY. Analysis of Factors Influencing Morphokinetic Characteristics of Embryos in ART Cycles. *Gynecological Endocrinology* 30, n° sup1 (octobre 2014): 6-8.

Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, et al. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2007;22:1973–81.

Guerif F, Lemseffer M, Bidault R, Gasnier O, Saussereau MH, Cadoret V, Jamet C, Royere D. 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.

Guerif F, Lemseffer M, Leger J, Bidault R, Cadoret V, Chavez C, Gasnier O, Saussereau MH, Royere D. Does early morphology provide additional selection power to blastocyst selection for transfer? *Reprod Biomed Online.* 2010 Oct;21(4):510-9.

Haadsma ML, Bukman A, Groen H, Roeloffzen EMA, Groenewoud ER, Heineman MJ. The number of small antral follicles (2-6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2007 Jul;22(7):1925–31.

Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2008 Mar;23(3):699–708.

Hardarson T. A Morphological and Chromosomal Study of Blastocysts Developing from Morphologically Suboptimal Human Pre-Embryos Compared with Control Blastocysts. *Human Reproduction* 18, n° 2 (1 février 2003): 399-407.

Hardy K, Stark J, Winston RML. Maintenance of the Inner Cell Mass in Human Blastocysts from Fragmented Embryos. *Biology of Reproduction* 68, n° 4 (1 avril 2003): 1165-69.

Harton GL, Munné S, Surrey M, Grifo J, Kaplan B, McCulloh DH. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertil Steril*. 2013;100:1695–703.

Hollier LM, Leveno KJ, Kelly MA, MC Intire DD, Cunningham FG. Maternal Age and Malformations in Singleton Births. *Obstetrics and Gynecology* 96, n° 5 Pt 1 (novembre 2000): 701-6.

Hook EB. Rates of Chromosome Abnormalities at Different Maternal Ages. *Obstetrics and Gynecology* 58, n° 3 (septembre 1981): 282-85. Hutterite birth histories. *Soc Biol* 2000;47:34-50.

INED, 2019.

INSEE, Estimations de population et statistiques de l'état civil, 2020.

INSERM, Enquête nationale périnatale, rapport 2016, paru en octobre 2017, 317p.

Institut National de Veille Sanitaire, 2010

Irani M, Zaninovic N, Rosenwaks Z, Xu K. Does Maternal Age at Retrieval Influence the Implantation Potential of Euploid Blastocysts? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 220, n° 4 (avril 2019): 379.e1-379.e7.

James A, Jamison M, Brancazio L, Myers E. Venous thromboembolism during pregnancy and the postpartum period: incidence, risk factors, and mortality. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:1311—5.

Janny L, Menezo YJ. Maternal Age Effect on Early Human Embryonic Development and Blastocyst Formation. *Molecular Reproduction and Development* 45, n° 1 (septembre 1996): 31-37.

Joseph KS, Allen AC, Dodds L, Turner LA, Scott H, Liston R. The perinatal effects of delayed childbearing. *Obstet Gynecol* 2005;105:1410—8.

Kang HJ, Melnick AP, Stewart JD, Xu K, Rosenwaks Z. Preimplantation Genetic Screening: Who Benefits? *Fertility and Sterility* 106, n° 3 (septembre 2016): 597-602.

Kenny LC, Lavender T, McNamee R, O'Neill SM, Mills T, Khashan AS. Advanced Maternal Age and Adverse Pregnancy Outcome: Evidence from a Large Contemporary Cohort. *PLoS ONE* 8, n° 2 (20 février 2013).

Khoshnood B, Bouvier-Colle MH, Leridon H, Blondel B. Impact of advanced maternal age on fecundity and women's and children's health. *Journal De Gynecologie, Obstetrique Et Biologie De La Reproduction* 37, n° 8 (décembre 2008): 733-47.

Kolibianakis C, Bourgain C, Albano K, Osmanagaoglu JS, Van Steirteghem A, Devroey P. 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.

Kolibianakis EM, Zikopoulos K, Verpoest W, Camus M, Joris H, Van Steirteghem AC. Should we advise patients undergoing IVF to start a cycle leading to a day 3 or a day 5 transfer? *Hum Reprod*. 2004;19:2550–4.

Korkmaz C, Tekin YB, Sakinci M, Ercan CM. Effects of Maternal Ageing on ICSI Outcomes and Embryo Development in Relation to Oocytes Morphological Characteristics of Birefringent Structures. *Zygote* 23, n° 4 (août 2015): 550-55.

Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M, Cizek-Sajko M. Developmental Capacity of Different Morphological Types of Day 5 Human Morulae and Blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online* 8, n° 6 (janvier 2004): 687-94.

La Marca A, Minasi MG, Sighinolfi G, Greco P, Argento C, Grisendi V, Fiorentino F, Greco E. Female Age, Serum Antimüllerian Hormone Level, and Number of Oocytes Affect the Rate and Number of Euploid Blastocysts in in Vitro Fertilization/Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles. *Fertility and Sterility* 108, n° 5 (novembre 2017): 777-783.e2.

Land JA. Risks and Complications in Assisted Reproduction Techniques: Report of an ESHRE Consensus Meeting. *Human Reproduction* 18, n° 2 (février 2003): 455-57.

Lane M, Mitchell M, Cashman KS, Feil D, Wakefield S, Zander-Fox DL. To QC or not to QC: the key to a consistent laboratory? *Reprod Fertil Dev*. (2008).

Larsen U, Yan S. The age pattern of fecundability: an analysis of French Canadian and Hutterite birth histories. *Mars 2000. Social biology* 47(1-2):34-50.

Leck I. Structural birth defects. In: Pless IB, editor. *The epidemiology of childhood disorders*. New York: Oxford University. Press; 1994. p. 66—117.

Lédée-Bataille N. Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure. *Fertil Steril*. 83, 598–605 (2005).

Lee CI, Wu CH, Pai YP, Chang YJ, Chen CI, Lee TH, Lee MS. Performance of Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy in IVF Cycles for Patients with Advanced Maternal Age, Repeat Implantation Failure, and Idiopathic Recurrent Miscarriage. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 58, n° 2 (mars 2019): 239-43.

Leridon H. Can Assisted Reproduction Technology Compensate for the Natural Decline in Fertility with Age? A Model Assessment. *Human Reproduction* 19, n° 7 (1 juillet 2004): 1548-53.

Lie Fong S, Visser JA, Welt CK, Rijke YB, Eijkemans MJC, Broekmans FJ, Roes EM. Serum Anti-Müllerian Hormone Levels in Healthy Females: A Nomogram Ranging from Infancy to Adulthood. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97, n° 12 (décembre 2012): 4650-55.

Mahajan N. Endometrial receptivity array: Clinical application. *Journal of Human Reproductive Sciences* 8, n° 3 (2015): 121-29.

Maheshwari A, Obstetric and Perinatal Outcomes in Singleton Pregnancies Resulting from the Transfer of Blastocyst-Stage versus Cleavage-Stage Embryos Generated through in Vitro Fertilization Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Fertility and Sterility* 100, n° 6 (décembre 2013): 1615-1621.e1-10.

Mastenbroek S, Twisk M, Van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007;357:9e17.

Mauroy C. Culture embryonnaire prolongée. Thèse de médecine. Service de Médecine et Biologie de La Reproduction du CHRU de Tours. 2017, 114 pages.

Ménézo Y, Barak Y. 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.

Mermillod P. Maturation de l'ovocyte. Chap 4. La reproduction animale et humaine, Editions Quae, 751 p., 2014, Synthèses, 978-2-7592-2208-7.

Meyer A. Une première maternité à 40 ans: l'impact médical sur la grossesse et l'accouchement. Mémoire de fin d'étude de sage-femme, Metz, 2007, 64 pages.

Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. Oocyte Aging: Cellular and Molecular Changes, Developmental Potential and Reversal Possibility. *Human Reproduction Update* 15, n° 5 (1 septembre 2009): 573-85.

Minasi MG, Colasante A, Riccio T, Ruberti A, Casciani V, Scarselli F, Spinella F, Fiorentino F, Varricchio MT, Greco E. Correlation between Aneuploidy, Standard Morphology Evaluation and Morphokinetic Development in 1730 Biopsied Blastocysts: A Consecutive Case Series Study. *Human Reproduction (Oxford, England)* 31, n° 10 (2016): 2245-54.

Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol.* déc 2008;199(6):660.e1- 5.

Munné S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, Tucker M. Positive Outcome after Preimplantation Diagnosis of Aneuploidy in Human Embryos. *Human Reproduction* 14, n° 9 (1 septembre 1999): 2191-99.

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.

Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2003;18:1307–12.

Nikolaou D, et A. Templeton. Early Ovarian Ageing: A Hypothesis. Detection and Clinical Relevance. *Human Reproduction (Oxford, England)* 18, n° 6 (juin 2003): 1137-39.

Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Mel- bye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *Br Med J* 2000;320:1708—12.

Oliveira FC, Surita FG, Silva JLP, Cecatti JG, Parpinelli MA, Haddad SM, Costa ML, Pacagnella RC, Sousa MH, Souza JP. Severe maternal morbidity and maternal near miss in the extremes of reproductive age: results from a national cross- sectional multicenter study. *BMC Pregnancy and Childbirth* 14 (20 février 2014): 77.

Olivennes F, 40 ans : jeune pour la vie, âgée pour la reproduction ! La lettre du gynécologue n°246. 1999.

Palermo GD, Schlegel PN, Hariprashad JJ, Ergün B, Mielnik A, Zaninovic N, Veeck LL, Rosenwaks Z. Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum Reprod.* 1999 Mar;14(3):741-8.

Pantos K, V. Athanasiou, K. Stefanidis, D. Stavrou, T. Vaxevanoglou, et M. Chronopoulou. Influence of Advanced Age on the Blastocyst Development Rate and Pregnancy Rate in Assisted Reproductive Technology. *Fertility and Sterility* 71, n° 6 (juin 1999): 1144-46.

Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, Devroey P. 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. 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;23:91–9.

Pellestor F. Âge maternel et anomalies chromosomiques dans les ovocytes humains. *Médecine/sciences* 20, n° 6-7 (1 juin 2004): 691-96.

Pinheiro RL, Areia AL, Pinto AM, Donato H. Advanced Maternal Age: Adverse Outcomes of Pregnancy, A Meta-Analysis. *Acta Médica Portuguesa* 32, n° 3 (29 mars 2019): 219-26.

Poulsen V, Ingerslev HJ, Kirkegaard K. Elective Embryo Transfers on Day 6 Reduce Implantation Compared with Transfers on Day 5. *Human Reproduction* 32, n° 6 (juin 2017): 1238-43.

Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril.* (2013) 99:37–43.

Rahib D, Le Guen M, Lydié N. Baromètre santé 2016. Contraception. Quatre ans après la crise de la pilule, les évolutions se poursuivent. Saint-Maurice : Santé publique France, 2017. 8 p.

Bernard J, Targa C, Murisier F, Paoloni-Giacobino A, Streuli I. Preimplantation genetic testing. *Rev Med Suisse.* 2019 Jan 9;15(N° 632-633):53-56.

Richards MK, Flanagan MR, Littman AJ, Burke AK, Callegari LS. Primary Cesarean Section and Adverse Delivery Outcomes among Women of Very Advanced Maternal Age. *Journal of Perinatology* 36, n° 4 (avril 2016): 272-77.

Rochebrochard E, *Population & Sociétés* n°556, INED, juin 2018.

Roizen NJ, Patterson D. Down's Syndrome. *The Lancet* 361, n° 9365 (avril 2003): 1281-89.

Roman H, Robillard P, Julien C, Kauffmann E, Laffitte A, Gabriel M. La grossesse après 40 ans chez 382 femmes : une étude rétrospective à l'Île de la Réunion. *J Gynecol Obs- tet Biol Reprod* 2004;33:615—22.

Royère D. Oocyte maturation: can oocyte competence be defined? *Journal De Gynecologie, Obstetrique Et Biologie De La Reproduction* 35, n° 5 Pt 2 (septembre 2006): 2S8-13.

Rubio C, Bellver J, Rodrigo L. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. *Fertil Steril* 2017;107:1122-9.

Sauer M, Miles RA, Dahmouch L, Paulson RJ, Press M, Moyer D. Evaluating the Effect of Age on Endometrial Responsiveness to Hormone Replacement Therapy: A Histologic Ultrasonographic, and Tissue Receptor Analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 10, n° 1 (janvier 1993): 47-52.

Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, Velde ER te. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril*. 1999 Nov;72(5):845–51.

Scholtes MC, Zeilmaker GH. Blastocyst Transfer in Day-5 Embryo Transfer Depends Primarily on the Number of Oocytes Retrieved and Not on Age. *Fertility and Sterility* 69, n° 1 (janvier 1998): 78-83.

Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2000;15:2394–403.

Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-Stage Biopsy Significantly Impairs Human Embryonic Implantation Potential While Blastocyst Biopsy Does Not: A Randomized and Paired Clinical Trial. *Fertility and Sterility* 100, n° 3 (septembre 2013): 624-30.

Sela R, Samuelov L, Almog B, Schwartz T, Cohen T, Amit A, et al. An embryo cleavage pattern based on the relative blastomere size as a function of cell number for predicting implantation outcome. *Fertil Steril*. (2012) 98:650–6.e654.

Semprini E, G. Simoni, Not so inefficient reproduction. *Lancet*. 356, 257–258 (2000).

Setti AS, Figueira RCS, Braga DPAF, Aoki T, Iaconelli A, Borges E. Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection Is Beneficial in Cases of Advanced Maternal Age: A Prospective Randomized Study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 171, n° 2 (décembre 2013): 286-90.

Shahine LK, Marshall L, Lamb JD, Hickok LR. Higher rates of aneuploidy in blastocysts and higher risk of no embryo transfer in recurrent pregnancy loss patients with diminished ovarian reserve undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2016;106:1124-8.

Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. A Comparison of Day 5 and Day 6 Blastocyst Transfers. *Fertility and Sterility* 75, n° 6 (juin 2001): 1126-30.

Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. Influence of Patient Age on the Growth and Transfer of Blastocyst-Stage Embryos. *Fertility and Sterility* 77, n° 4 (avril 2002): 700-705.

Shrim A, Levin I, Mallozzi A, Brown R, Salama K, Gamzu R, Almog B. Does Very Advanced Maternal Age, with or without Egg Donation, Really Increase Obstetric Risk in a Large Tertiary Center? *Journal of Perinatal Medicine* 38, n° 6 (1 novembre 2010): 645-50.

Sifer C. Est-il utile d'observer les embryons aux stades précoces de leur développement quand une culture prolongée est effectuée ? *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 2016;44:441–3.

Simchen MJ, Shulman A, Wiser A, Zilberberg E, Schiff E. The Aged Uterus: Multifetal Pregnancy Outcome after Ovum Donation in Older Women. *Human Reproduction* (Oxford, England) 24, n° 10 (octobre 2009): 2500-2503.

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

Soares SR, Troncoso C, Bosch E, Serra V, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Age and Uterine Receptiveness: Predicting the Outcome of Oocyte Donation Cycles. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90, n° 7 (juillet 2005): 4399-4404.

Söderström-Anttila V. Pregnancy and Child Outcome after Oocyte Donation. *Human Reproduction Update* 7, n° 1 (février 2001): 28-32.

Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Comparison of Blastocyst Transfer with or without Preimplantation Genetic Diagnosis for Aneuploidy Screening in Couples with Advanced Maternal Age: A Prospective Randomized Controlled Trial. *Human Reproduction* 19, n° 12 (1 décembre 2004): 2849-58.

Stensen MH, Tanbo T, Storeng R, Byholm T, Fèdorcsak P. Routine Morphological Scoring Systems in Assisted Reproduction Treatment Fail to Reflect Age-Related Impairment of Oocyte and Embryo Quality. *Reproductive Biomedicine Online* 21, n° 1 (juillet 2010): 118-25.

Sullivan-Pyke C, Dokras A. Preimplantation Genetic Screening and Preimplantation Genetic Diagnosis. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 45, n° 1 (mars 2018): 113-25.

Sundvall L, Ingerslev HS, Knudsen UB, Kirkegaard K. Inter- and Intra-Observer Variability of Time-Lapse Annotations. *Human Reproduction* (Oxford, England) 28, n° 12 (décembre 2013): 3215-21.

Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, Von Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Updat.* 12, 617–630 (2006).

Tannus S, Son WY, Shavit T, Dahan MH.. Elective Single Blastocyst Transfer in Advanced Maternal Age. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 34, n° 6 (juin 2017a): 741-48.

Tannus S, Cohen Y, Son WY, Shavit T, Dahan MH. Cumulative Live Birth Rate Following Elective Single Blastocyst Transfer Compared with Double Blastocyst Transfer in Women

Aged 40 Years and Over. Reproductive Biomedicine Online 35, n° 6 (décembre 2017b): 733-38.

Tarín JJ, García-Pérez MA, Cano A. Assisted Reproductive Technology Results: Why Are Live-Birth Percentages so Low? Molecular Reproduction and Development 81, n° 7 (juillet 2014): 568-83.

Thomas MR, Sparks AE, Ryan GL, Van Voorhis BJ. Clinical Predictors of Human Blastocyst Formation and Pregnancy after Extended Embryo Culture and Transfer. Fertility and Sterility 94, n° 2 (juillet 2010): 543-48.

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.

Thouas GA, Dominguez F, Green MP, Vilella F, Simon C, Gardner DK. Soluble Ligands and Their Receptors in Human Embryo Development and Implantation. Endocrine Reviews 36, n° 1 (1 février 2015): 92-130.

Tomazevic T, S Korosec, I Virant Klun, S Drobic, I Verdenik. Age, Oestradiol and Blastocysts Can Predict Success in Natural Cycle IVF–Embryo Transfer. Reproductive BioMedicine Online 15, n° 2 (janvier 2007): 220-26.

Tournaire M. Le bonheur d’être mère : La grossesse après 35 ans. Odile Jacob. Paris, 2005.

Ubaldi FM, Capalbo A, Colamaria S, Ferrero S, Maggiulli R, Vajta G, Sapienza F. Reduction of multiple pregnancies in the advanced maternal age population after implementation of an elective single embryo transfer policy coupled with enhanced embryo selection: pre- and post-intervention study. Human Reproduction (Oxford, England) 30, n° 9 (septembre 2015): 2097-2106.

Ubaldi FM, Cimadomo D, Vaiarelli A, Fabozzi G, Venturella R, Maggiulli R, Mazzilli R, Ferrero S, Palagiano A, Rienzi L. Advanced Maternal Age in IVF: Still a Challenge? The Present and the Future of Its Treatment. Frontiers in Endocrinology 10 (20 février 2019).

Vaiarelli A, Cimadomo D, Ubaldi N, Rienzi L, Ubaldi FM. What is new in the management of poor ovarian response in IVF? Curr Opin Obstet Gynecol. (2018) 30:155–62.

Van der Auwera I, Debrock S, Spiessens C, Afschrift H, Bakelants E, Meuleman C. A prospective randomized study: day 2 versus day 5 embryo transfer. Hum Reprod Oxf Engl. 2002;17:1507–12.

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

Vialard F, Lombroso R, Bergere M, Molina Gomes D, Hammoud I, Bailly M, Selva J. Oocyte Aneuploidy Mechanisms Are Different in Two Situations of Increased Chromosomal Risk: Older Patients and Patients with Recurrent Implantation Failure after in Vitro Fertilization. *Fertility and Sterility* 87, n° 6 (juin 2007): 1333-39.

Viñals G, Odia, R Naja R, Serhal P, Saab W, Seshadri S, Ben-Nagi J. Euploid blastocysts implant irrespective of their morphology after NGS-(PGT-A) testing in advanced maternal age patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 36, n° 8 (août 2019): 1623-29.

Waldenström U, Aasheim V, Nilsen ABV, Rasmussen S, Pettersson HJ, Shytt E. Adverse Pregnancy Outcomes Related to Advanced Maternal Age Compared With Smoking and Being Overweight. *Obstetrics & Gynecology* 123, n° 1 (janvier 2014): 104–112.

Warshaviak M, Kalma Y, Carmon A, Samara N, Dviri M, Azem F, Ben-Yosef D. The Effect of Advanced Maternal Age on Embryo Morphokinetics . *Frontiers in Endocrinology* 10 (25 octobre 2019).

Wilcox A, Morken N, Weinberg C, Håberg S, Magnus M. Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: prospective register based study. *The BMJ* 364 (20 mars 2019).

Williams CJ, Erickson GF. *Morphology and Physiology of the Ovary*. 2012.

Wilson M, Hartke K, Kiehl M, Rodgers J, Brabec C, Lyles R. Integration of blastocyst transfer for all patients. *Fertil Steril*. 2002 Apr;77(4):693-6.

Wu D, Reynolds K, Maxwell R, Lindheim S, Aubuchon M, Thomas M. Age Does Not Influence the Effect of Embryo Fragmentation on Successful Blastocyst Development. *Fertility and Sterility* 95, n° 8 (juin 2011): 2778-80.

Zech NH, Lejeune B, Puissant F, Vanderzwalmen S, Zech H, Vanderzwalmen P. 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.

Zhu C, Wang M, Niu G, Yang J, et Wang Z. Obstetric Outcomes of Twin Pregnancies at Advanced Maternal Age: A Retrospective Study. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 57, n° 1 (février 2018): 64-67.

Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T. 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.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) SAINTE-ROSE Romane

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : 21709939

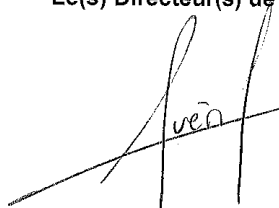
N° Thèse : 58

Nom et Prénom : Sainte-Rose Romane

Sujet : Impact de l'âge de la femme sur le devenir biologique et clinique des embryons mis en culture prolongée.

Tours, le : 06/11/2020

Le(s) Directeur(s) de Thèse :



Vu et Transmis :
Le Doyen

SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : **21709939**

N° Thèse : **58**

Nom et Prénom : **SAINTE-ROSE Romane**

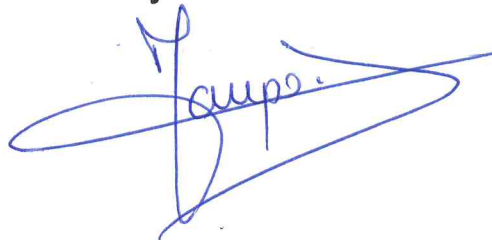
Sujet : **Impact de l'âge de la femme sur le devenir biologique et clinique des embryons mis en culture prolongée.**

.....

Tours, le : **04/11/2020**

Le(s) Directeur(s) de Thèse : *F. Guérif*

**Vu et Transmis :
Le Doyen**



Impact de l'âge de la femme sur le devenir biologique et clinique des embryons mis en culture prolongée

Introduction : Le désir retardé de grossesse est de plus en plus fréquent dans la population générale. Or, en ce qui concerne la procréation, l'âge de la femme est un des facteurs les plus critiques du succès. Pour les couples dont la femme présente un Âge Maternel Avancé (AMA), les techniques d'Aide Médicale à la Procréation (AMP) pourraient apparaître comme un traitement opportun pour compenser le déclin de la fertilité lié à l'âge. La Culture Prolongée (CP) embryonnaire jusqu'au stade blastocyste améliore les chances de transfert d'embryon «viables» et les taux d'implantation. Cette CP, dont l'usage est en extension, pourrait alors représenter un outil précieux pour la sélection des embryons à un AMA.

Matériels et Méthodes : Ce travail a évalué l'impact de l'âge de la femme sur les résultats biologique et clinique de la CP. Il a été mené, rétrospectivement, au sein du service de Médecine et Biologie de la Reproduction du CHRU de Tours entre 2011 et 2019. Cela a conduit à recueillir les données de 4963 patientes de FIV, soit 24 520 embryons à J2 puis 14 262 blastocystes obtenus à J5 ou J6. Suite à l'analyse des données individuelles d'âge de la femme, nous avons pu regrouper certains âges répartis comme suit; [20-22], [23-36], [37-40], [41-43] ans. Le groupe [23-36 ans] a constitué le groupe de référence de l'étude.

Résultats : En ce qui concerne les résultats biologiques, l'âge de la femme a une incidence sur le taux global de blastocyste. En effet, ce dernier est plus faible aux âges extrêmes (48% chez les femmes de [20-23 ans] et [40-43 ans] versus 59% pour le groupe de référence). Si le taux de blastocyste n'est pas influencé par le nombre d'ovocytes obtenus à la ponction quel que soit l'âge de la femme, il est, en revanche impacté par le nombre d'Embryons de « Top Qualité » (TQE) disponible à J2. Si l'âge de la femme n'influence pas la cinétique d'obtention des blastocystes en termes de jour (J5 vs J6), nous avons observé que, lorsque l'âge de la femme augmente, le stade d'expansion du blastocyste est ralenti, sans affecter l'organisation des cellules du trophoctoderme et de la masse cellulaire interne. Enfin si le taux de blastocystes « utiles » (blastocystes transférés ou congelés) n'est globalement pas influencé par l'âge de la femme, la part de blastocystes disponibles pour la congélation diminue lorsque l'âge de la femme augmente.

En ce qui concerne les résultats cliniques, si le taux global de transfert est influencé par le nombre de TQE disponible à J2, il est relativement stable (80%) quel que soit l'âge de la femme. En revanche, le taux de naissance est influencé par l'âge de la femme. En effet, ce taux passe de 32% chez les femmes de [23-36 ans] à 14% chez les femmes de [41-43 ans]. Le taux de grossesse multiple par naissance ne dépend pas de l'âge de la femme.

Discussion/Conclusion : Nos résultats suggèrent que l'AMP ne peut pas compenser l'ensemble des facteurs physiologiques sous-jacents à la baisse de la fertilité liée à l'âge (diminution du stock et vieillissement des ovocytes). Il est important de communiquer ces résultats aux couples pris en charge dans un centre d'AMP afin de les éclairer sur les chances réelles et personnalisées de succès en FIV.

Mots clés : Âge maternel avancé, blastocyste, culture prolongée, implantation, morphologie

PRÉSIDENT DU JURY : M. Professeur Karine MAHEO, PU, UMR INSERM 1069 Nutrition, Croissance et Cancer, UFR Pharmacie - Tours

MEMBRES DU JURY : Professeur Fabrice GUERIF, Biologie et médecine du développement et de la reproduction, Faculté de Médecine – Tours

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

Docteur Cynthia FRAPSAUCE, Biologie et médecine du développement et de la reproduction, PH, CHU – Tours

Date de soutenance : 22 octobre 2020