

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Ex. 2

Année : 2010

N° 7070

**INTÉRÊT DE LA CONGÉLATION AU STADE DE BLASTOCYSTE  
ÉVALUATION RÉTROSPECTIVE DE LA PRATIQUE  
DE CONGÉLATION AU CHU DE GRENOBLE**

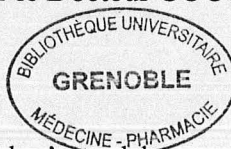
**MÉMOIRE**  
**DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE**  
Conformément aux dispositions du décret n°2003-76 du 23 janvier 2003, tient lieu de

**THÈSE**  
en vue de l'obtention du diplôme d'État de docteur en pharmacie  
présenté à la Faculté de Pharmacie de Grenoble  
et soutenu publiquement le 16 décembre 2010

Par  
Hélène LHEUREUX  
Née le 13 juillet 1981 à Bergues

Devant le jury composé de :

Président du jury    Monsieur le Professeur FAURE P.  
Membres                Madame le Docteur BERGUES U.  
                              Madame le Docteur THOMAS CADI C.  
                              Monsieur le Docteur COUTTON C.



La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leur auteurs.

Année : 2010

**INTÉRÊT DE LA CONGÉLATION AU STADE DE BLASTOCYSTE**  
**ÉVALUATION RÉTROSPECTIVE DE LA PRATIQUE**  
**DE CONGÉLATION AU CHU DE GRENOBLE**

MÉMOIRE  
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE  
Conformément aux dispositions du décret n°2003-76 du 23 janvier 2003, tient lieu de

**THÈSE**

en vue de l'obtention du diplôme d'État de docteur en pharmacie  
présenté à la Faculté de Pharmacie de Grenoble  
et soutenu publiquement le 16 décembre 2010

Par

Hélène LHEUREUX  
Née le 13 juillet 1981 à Bergues

Devant le jury composé de :

Président du jury    Monsieur le Professeur FAURE P.  
Membres                Madame le Docteur BERGUES U.  
                              Madame le Docteur THOMAS CADI C.  
                              Monsieur le Docteur COUTTON C.





**UFR  
DE PHARMACIE  
DE GRENOBLE**



**UNIVERSITE  
JOSEPH FOURIER**  
SCIENCES. TECHNOLOGIE. SANTÉ

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
**FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur Renée GRILLOT  
Vice-Doyen et Directeur des Etudes : Mme Edwige NICOLLE  
Année 2009-2010

**PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n=17)**

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (LR)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wilhelm	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B - LAN)
CALOP	Jean	Physiologie Pharmacologie (HP2)
DANEL	Vincent	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
DROUET	Christian	Pharmacotechnie (D.P.M)
DROUET	Emmanuel	Droit Pharmaceutique
FAURE	Patrice	Biochimie (L.B.F.A.)
GODIN-RIBUOT	Diane	Biotechnologies (I.B.S.)
GRILLOT	Renée	Pharmacotechnie (D.P.M.)
LENORMAND	Jean Luc	Microbiologie (U.V.H.C.I. / MCU-PH)
PEYRIN	Michel	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
SEVE	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
ROUSSEL	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
WOUESSIDJEW	Marie	Physiologie -Pharmacologie (HP2)

Mise à jour le 03/09/2009

DOMAINE DE LA MERCI - 38706 LA TRONCHE CEDEX - FRANCE - TELEPHONE +33 (0)4 76 63 71 00 - FAX +33 (0)4 76 53 71 70

UNIVERSITE JOSEPH FOURNIER  
**FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur Renée GRILLOT  
Vice -Doyen et Directeur des Etudes : Mme Edwige NICOLLE  
Année 2009-2010

**MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n = 32)**

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie - Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.FA)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B - LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (U.V.H.C.I)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A.)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S.)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M.)
GERMI	Raphaële	Microbiologie (U.V.H.C.I / MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M.)
GUIEU	Valerie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie -Pharmacologie (HP2)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
MELO DE LIMA	Christelle	Probabilités Biostatistiques (LE.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique (D.P.M.)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (CIB / MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M.)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I)
VANHAVERBEKE	Cecile	Chimie organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M.)

Mise à jour le 03/09/2009

DOMAINE DE LA MERCI - 38706 LA TRONCHE CEDEX - FRANCE - TELEPHONE +33 (0)4 76 63 71 00 - FAX +33 (0)4 76 53 71 70

### **PROFESSEUR EMERITE (n=1)**

FAVIER                                  Alain

### **PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=2)**

RIEU                                      Isabelle                      Qualitologie (Praticien Attaché - CHU)

TROUILLER                              Patrice                      Santé Publique (Praticien Hospitalier - CHU)

### **PROFESSEUR AGREGE (PRAG) (n=1)**

GAUCHARD                              Pierre Alexis              Chimie (D.P.M.)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire  
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire  
IAB : Institut Albert Bonniot  
LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée  
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie  
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel  
PRAG : Professeur Agrégé  
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 03/09/2009

DOMAINE DE LA MERCI - 38706 LA TRONCHE CEDEX - FRANCE - TELEPHONE +33 (0)4 76 63 71 00 - FAX +33 (0)4 76 53 71 70

## ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

COLLE	Pierre Emmanuel	Maître de Conférences
FITE	Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER	Laurence	Professeur Certifié

## ATER (n=5)

ATER	ELAZZOUZI Samira	Pharmacie Galénique
ATER	SHEIKH HASSAN Amhed	Pharmacie Galénique
ATER	MAS Marie	Anglais Master ISM
ATER	ROSSI Caroline	Anglais Master ISM
ATER	SAPIN Emilie	Physiologie Pharmacologie

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIB : Centre d'Innovation en Biologie

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »

IBS : Institut de Biologie Structurale

LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenese des Microorganismes

LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux

LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine

TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition

UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 03/09/2009

DOMAINE DE LA MERCI - 38706 LA TRONCHE CEDEX - FRANCE - TELEPHONE +33 (0)4 76 63 71 00 - FAX +33 (0)4 76 53 71 70

## Remerciements

*A Monsieur le Professeur Patrice Faure,*

*Vous me faites l'honneur et le plaisir de juger ce travail et de présider cette thèse. Trouvez ici l'expression de mon plus profond respect et de ma reconnaissance.*

*A Madame le Docteur Ulrike Bergues,*

*Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée et de toujours m'avoir accueillie à bras ouverts dans votre service. J'espère que ce travail sera à la hauteur de vos espérances. Soyez assurée de ma gratitude et de mon dévouement.*

*A Madame le Docteur Claire Thomas Cadi,*

*Tu me fais grand plaisir de participer à ce jury de thèse, en ta qualité de médecin mais aussi d'amie. Merci pour tes conseils dans l'élaboration et la rédaction de ce travail.*

*A Monsieur le Docteur Charles Coutton,*

*Merci à toi d'avoir spontanément accepté de participer à ce jury de thèse. Ne compte pas sur moi pour t'appeler 'maitre'.*

*A Caroline pour ta gentillesse, ta compétence et ta disponibilité qui m'a donné goût à la biologie de la reproduction.*

*A Madame Hennebicq pour la richesse de votre enseignement et à Claudine pour votre sympathie.*

*A toute l'équipe de BDR de Grenoble : Tartine, Mag, MC, So et Françoise (mes futures belles-mères), Hono (pour ton pep's), Bernadette (pour tes gâteaux au citron et ta gentillesse), Pierre et JB (pour leur testostérone), Lynda et Emilie (pour compenser la testostérone des fivistes) pour votre bonne humeur, votre patience et les potins au café.*

*A toute l'équipe de médecine de la procréation pour tout ce que vous m'avez apporté. Merci pour nos fabuleuses escapades au bloc.*



*A maman pour tous les sacrifices que tu as faits pour nous, pour nous avoir enseigné ta philosophie de la vie. Je pense sans me tromper dire que tu es la meilleure môman au monde. Il ne te reste plus qu'à te frotter les mains « une bonne chose de faite, on va bien dormir ce soir ! ».*

*Nico, j'attends avec impatience de te voir en robe en dehors du carnaval.*

*A Antoine, Débo, Marceau, les mouettes et le peignoir de bain.*

*A ma famille...*

*A mes amis...*

# TABLES DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>6</b>
<b>ABRÉVIATIONS</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>12</b>
<b>1 GENERALITES SUR LA FECONDATION <i>IN VITRO</i></b>	<b>13</b>
1.1 FECONDATION ET DEVELOPPEMENT DE L'EMBRYON PREIMPLANTATOIRE (FIGURE 2)	13
1.1.1 Statut morphologique des zygotes : 1 <sup>er</sup> jour (J1)	13
1.1.2 Développement embryonnaire précoce : 2 <sup>e</sup> et 3 <sup>e</sup> jour (J2-J3)	14
1.1.3 Développement jusqu'au stade de blastocyste	14
1.1.4 Activation du génome embryonnaire	15
1.1.5 Développement des milieux de culture de blastocystes	17
1.2 TRANSFERT EMBRYONNAIRE	19
1.3 CONGELATION EMBRYONNAIRE	19
1.3.1 Congélation lente	20
1.3.2 Vitrification	21
<b>2 REVUE DE LA LITTERATURE</b>	<b>22</b>
2.1 INTERET DE LA CULTURE PROLONGEE	22
2.1.1 Sélection des embryons	22
2.1.2 Condition d'implantation plus proche de la physiologie	23
2.1.3 Diminution du taux de grossesse multiple	24
2.2 INCONVENIENTS DE LA CULTURE PROLONGEE	25
2.2.1 Annulations de transfert et/ou de congélation	25
2.2.2 Augmentation de la fréquence des gémellités monozygotiques	25
2.2.3 Déséquilibre du sex-ratio	26
2.3 COMPARAISON DES RESULTATS APRES TRANSFERT « FRAIS » (STADE CLIVE <i>VERSUS</i> STADE BLASTOCYSTE)	26
2.4 INTERET DE LA CONGELATION APRES CULTURE PROLONGEE	28

**INTRODUCTION** 29**MATÉRIELS ET MÉTHODES** 30

1. Généralités sur la pratique du centre 30
2. Recueil de données 31
3. Caractéristiques des couples inclus 33
4. Analyses statistiques 35

**RÉSULTATS** 36

Évolution de la proportion des congélations embryonnaires au stade de blastocyste 36

**Première partie : Analyse des données des transferts d'embryon(s) congelé(s)** 37

1. Évolution annuelle du nombre de TEC 37
2. Annulations de transfert 39
3. Taux de survie embryonnaire après décongélation 39
4. Grossesses et issues de grossesses après TEC 40
5. Nombre d'embryon(s) transféré(s) par TEC 42
6. Taux d'implantation embryonnaire après TEC 42
7. Taux de grossesses multiples et taux de fausses couches après TEC 43
8. Analyses des résultats 44

**Deuxième partie : Résultats des taux cumulés de grossesses** 45**DISCUSSION** 47**CONCLUSION** 53**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES** 55

## ABRÉVIATIONS

- **ABM** : Agence de la Biomédecine
- **AMP** : Assistance Médicale à la Procréation
- **ARNm** : Acide RiboNucléique messenger
- **CHU** : Centre Hospitalo-Universitaire
- **FDA** : Food and Drug Administration
- **FIV** : Fécondation *In Vitro*
- **FSH** : Follicle Stimulating Hormone
- **GnRH** : Gonadotropin Releasing Hormone
- **hCG** : human Chorionic Gonadotropin
- **HSO** : Syndrome d'Hyperstimulation Ovarienne
- **ICSI** : IntraCytoplasmic Sperm Injection
- **LH** : Luteinizing Hormone
- **MCI** : Masse Cellulaire Interne
- **PN** : Pronoyau
- **TEC** : Transfert d'Embryon(s) Congelé(s)

## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

<i>Tableau I : Milieux séquentiels commercialisés pour la culture embryonnaire préimplantatoire</i> -----	18
<i>Tableau II : Milieux globaux commercialisés pour la culture embryonnaire préimplantatoire</i> -----	18
<i>Tableau III : Sex-ratio des enfants issus d'un transfert de blastocyste ou d'embryon clivé à J3</i> -----	26
<i>Tableau IV : Résultats des études randomisées prospectives incluant des patientes de bon pronostic</i> -----	27
<i>Tableau V : Résultats des études randomisées prospectives incluant des patientes peu sélectionnées</i> -----	27
<i>Tableau VI : Résultats des études randomisées prospectives incluant des patientes de mauvais pronostic</i> -----	28
<i>Tableau VII : Comparaison de l'âge des patients et du rang de la tentative</i> -----	38
<i>Tableau VIII : Comparaison des caractéristiques des tentatives de FIV</i> -----	38
<i>Tableau IX : Taux de survie embryonnaire après décongélation</i> -----	39
<i>Tableau X : Taux de grossesses et taux d'accouchements par TEC</i> -----	41
<i>Tableau XI : Nombre moyen d'embryon transféré par TEC</i> -----	42
<i>Tableau XII : Taux d'implantation embryonnaire après TEC</i> -----	42
<i>Tableau XIII : Taux de grossesses gémellaires et taux d'accouchements multiples après TEC.</i> -----	43
<i>Tableau XIV : Taux de fausses couches après TEC</i> -----	43
<i>Tableau XV : Influence du jour de congélation du blastocyste sur les taux de grossesses et les taux d'implantation après TEC</i> -----	44
<i>Tableau XVI : Influence du nombre d'embryons transférés sur les taux de grossesses cliniques et sur les taux de grossesses multiples après TEC</i> -----	44
<i>Tableau XVII : Comparaison de l'âge des patients et du rang de la tentative</i> -----	45
<i>Tableau XVIII : Comparaison des caractéristiques des tentatives de FIV</i> -----	46
<i>Tableau XIX : Résultats cumulés des transferts « frais » + TEC</i> -----	46
<i>Figure 1 : Représentation schématique d'un blastocyste expansé</i> -----	15
<i>Figure 2 : Aspect morphologique de l'embryon préimplantatoire</i> -----	16
<i>Figure 3 : Trajet physiologique de l'embryon dans les voies génitales féminines</i> -----	24
<i>Figure 4 : Évolution annuelle du nombre de cycles de congélation embryonnaire</i> -----	36
<i>Figure 5 : Évolution annuelle du nombre de TEC</i> -----	37
<i>Figure 6 : Évolution annuelle du nombre d'annulations de transfert embryonnaire après décongélation</i> -----	39
<i>Figure 7 : Évolution du nombre de grossesses cliniques.</i> -----	40
<i>Figure 8 : Évolution du nombre d'accouchements</i> -----	40
<i>Figure 9 : Évolution du nombre moyen d'embryon transféré par TEC</i> -----	42

## INTRODUCTION

Depuis la première naissance de Louise Brown, en 1978, la Fécondation *In Vitro* (FIV) a permis à de nombreux couples infertiles d'obtenir une grossesse et d'avoir un enfant en bonne santé.

Dans le but d'une amélioration constante des résultats, les pratiques et techniques évoluent constamment. Parmi les techniques particulières appliquées aux FIV, nous nous sommes intéressés à la culture prolongée qui consiste à prolonger de 3 jours en moyenne la culture embryonnaire, pour identifier les embryons capables de se développer *in vitro* jusqu'au stade de blastocyste. Actuellement, le transfert d'embryon au stade de blastocyste n'est pas une pratique proposée aux couples de façon systématique dans tous les centres d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) en France et ne représente que 11,6% de l'ensemble des tentatives de FIV [1].

Le centre d'AMP de Grenoble a décidé de développer la culture prolongée fin 2005. Le transfert intra-utérin de blastocystes est réalisé avec des embryons frais ou après congélation. Dans cette étude rétrospective, nous avons voulu évaluer tout particulièrement la pratique de congélation embryonnaire au stade blastocyste. Les résultats de cette étude seront présentés après une partie de rappels présentant des généralités sur la FIV et une analyse de la littérature sur l'état des lieux de la pratique de la culture prolongée.

# 1 Généralités sur la Fécondation *In Vitro*

La fécondation *in vitro* (FIV) est une technique de procréation médicalement assistée qui permet la naissance d'environ 2% des nouveau-nés en France. Cette méthode consiste à mettre en contact des gamètes hors de l'appareil génital féminin dans le but d'obtenir des embryons et de permettre leur développement préimplantatoire en culture *in vitro*.

Au préalable, la stimulation ovarienne par des hormones hypophysaires : FSH (Follicle Stimulating Hormone) ± LH (Luteinizing Hormone), va permettre le développement de plusieurs follicules. Le suivi de la croissance folliculaire par des dosages hormonaux (œstradiol E2) et par échographie permettra d'estimer la date favorable au déclenchement de l'ovulation par une injection d'hCG (human Chorionic Gonadotropin). La ponction de ces follicules est réalisée sous anesthésie générale ou locale 36 heures après l'injection, c'est-à-dire juste avant l'ovulation. Le jour du recueil, les ovocytes prélevés sont mis en contact avec les spermatozoïdes. Les gamètes masculins ou spermatozoïdes ayant été obtenus par masturbation ou ponction chirurgicale épipidymo-testiculaire.

## 1.1 Fécondation et développement de l'embryon préimplantatoire (figure 2)

Il existe deux techniques de FIV pour la mise en contact des gamètes : la fécondation conventionnelle où les spermatozoïdes sont mis en contact avec l'ovocyte dans un milieu de culture, le spermatozoïde pénétrant dans l'ovocyte comme dans une fécondation physiologique, et la fécondation par micro-injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI) où le spermatozoïde est injecté directement à l'intérieur du cytoplasme de l'ovocyte.

Suite à la fécondation, les embryons mis en culture dans des milieux appropriés sont observés quotidiennement.

### 1.1.1 Statut morphologique des zygotes : 1<sup>er</sup> jour (J1)

Les embryons sont en culture dans un milieu de culture adapté (dans notre laboratoire : Origio ISM1<sup>TM</sup>) à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Après 16 à 20 heures, la fécondation est confirmée par la présence de 2 pronoyaux (PN). L'assemblage, la croissance et la fusion mutuelle de précurseurs nucléolaires constituent la phase précoce de nucléogénèse selon une représentation morphologique et chronologique établie pour les zygotes humains.

### 1.1.2 Développement embryonnaire précoce : 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> jour (J2-J3)

A partir du 2<sup>e</sup> jour les embryons sont observés et cotés selon leur morphologie (nombre, taille et régularité des cellules ou blastomères, présence ou non de fragments avec quantification). Les deux premières cellules ou blastomères apparaissent après une première division mitotique 25 à 27 heures après la fécondation. La segmentation permettra la formation d'un nombre croissant de blastomères à l'intérieur de la zone pellucide, sans augmentation globale du volume de l'embryon. Pour un développement embryonnaire optimal associé à des chances maximales d'implantation sont observés 4 blastomères à J2 et 8 blastomères à J3, et peu ou pas de fragments [2].

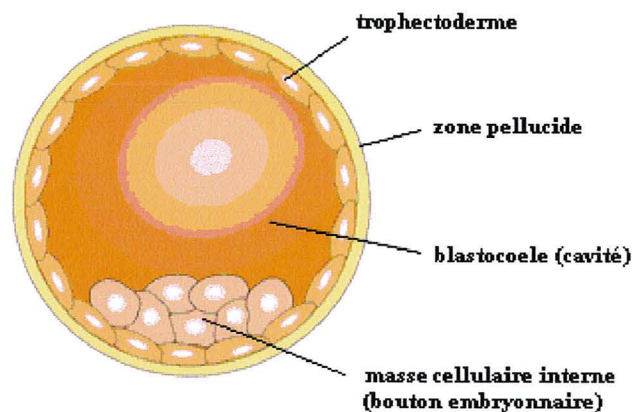
### 1.1.3 Développement jusqu'au stade de blastocyste

Après le troisième jour, les embryons sont placés dans un autre milieu adapté à la culture prolongée (Origio ISM2<sup>TM</sup>), la culture peut alors être continuée jusqu'au cinquième ou sixième jour de développement. On observe le développement embryonnaire jusqu'au stade de blastocyste, étape précédant l'éclosion de l'embryon en dehors de la zone pellucide permettant son implantation dans la muqueuse utérine.

Au 4<sup>ème</sup> jour de développement (J4), un nombre de blastomères compris entre 16 et 32 vont fusionner, on parle alors d'embryon compacté ou morula. Les blastomères périphériques de la morula vont adhérer progressivement les uns aux autres par leur face latérale grâce à des gap-junctions tandis que les autres blastomères centraux restent en contact par toute leur surface. Lorsque la compaction est établie, l'eau pénètre à l'intérieur de la morula pour former des espaces intercellulaires qui fusionnent pour former une cavité unique : le blastocœle.

Le blastocœle augmente progressivement de taille et au 5<sup>e</sup> jour (J5), l'embryon est appelé blastocyste. A ce stade les blastomères centraux constituent la masse cellulaire interne (MCI), cellules n'ayant pas de contact avec l'extérieur, à l'origine de l'embryon proprement-dit. Les blastomères périphériques constituent le trophoctoderme, s'aplatissent et forment la paroi du blastocyste à l'origine de la constitution des annexes embryonnaires. Le blastocyste, subit une phase d'expansion jusqu'au stade de blastocyste expansé, étape ultime *in vitro* avant l'éclosion *in utero* et l'implantation.





**Figure 1 : Représentation schématique d'un blastocyste expansé**

Des critères morphologiques incluant la taille de la cavité, la densité et la continuité de l'assise cellulaire trophoblastique, la densité et la cohésion du bouton embryonnaire, ont été reliés avec le potentiel implantatoire du blastocyste [3].

#### **1.1.4 Activation du génome embryonnaire**

Lors des premières phases de divisions mitotiques embryonnaires, les ARNm et les protéines nécessaires aux mitoses proviennent essentiellement des réserves accumulées par l'ovocyte au cours de la folliculogénèse. Dans l'espèce humaine, le début de production d'ARNm propre à l'embryon (c'est-à-dire le début de la transcription de son génome) est soumis à une phase d'activation du génome embryonnaire qui se situe vers le troisième jour du développement [4]. On parle d'activation génomique majeure car certains gènes embryonnaires seraient probablement transcrits avant le troisième jour du développement [5-6].

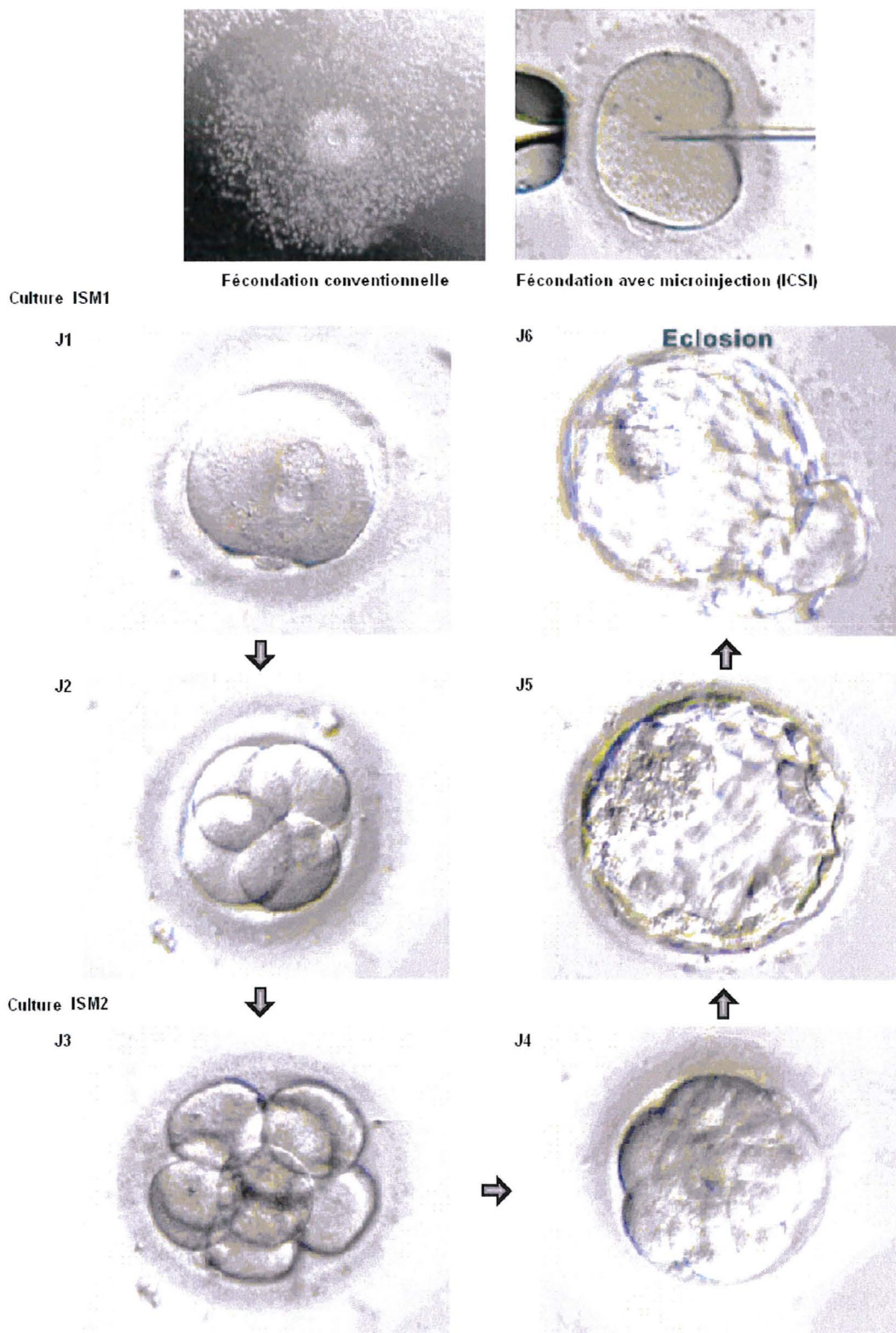


Figure 2 : Aspect morphologique de l'embryon préimplantatoire : J1. Aspect typique de zygote avec apposition des pronucléi et alignement des précurseurs nucléolaires. J2. Embryon avec quatre blastomères de taille identique, comportant chacun un noyau unique en interphase, sans exsudat cytoplasmique. J3. Embryon avec huit blastomères. J4. Morula compactée. J5. Blastocyste expansé avec masse cellulaire interne dense et assise de cellules trophoblastiques jointives. J6. Blastocyste après éclosion.

### 1.1.5 Développement des milieux de culture de blastocystes

Différents milieux ont été et sont utilisés pour permettre le développement embryonnaire jusqu'au stade de blastocyste.

#### - Utilisation des co-cultures

Depuis le début des années 90, différents supports cellulaires ont été utilisés en embryologie humaine : des tapis cellulaires d'origine génitale (cellules du cumulus, de la granulosa, de l'oviducte, de l'utérus) mais aussi d'origine extra-génitale : la lignée VERO, lignée cellulaire établie à partir de cellules épithéliales de reins de singe [7]. La co-culture a permis une meilleure connaissance de la physiologie du blastocyste et a apporté des informations concernant le rôle des cellules nourricières dans la prévention de la formation des radicaux libres, la détoxification et la libération des facteurs de croissance.

#### - Utilisation des milieux séquentiels

L'aspect contraignant des co-cultures, ainsi que les exigences de sécurité microbiologique ont conduit au développement de milieux séquentiels actuellement utilisés (Tableau I). Ces milieux proposés par les industriels visent à suivre l'évolution métabolique de l'embryon par une composition biochimique dynamique afin de reproduire le mieux possible les conditions physiologiques du développement embryonnaire rencontrées dans les trompes puis dans l'utérus. L'activation du génome embryonnaire étant l'étape clé, on expose successivement les embryons à deux milieux de culture différents : un premier milieu de J0 à J2 contenant de faibles concentrations de glucose et d'un ou plusieurs acides aminés, puis un deuxième milieu contenant des concentrations plus élevées de glucose et d'une plus large gamme d'acides aminés, à J3 pour favoriser la compaction de l'embryon et l'obtention du blastocyste [8]. Le premier milieu biséquentiel G1/G2 a été développé en 1998 par Gardner [9]. Avec l'émergence de ces nouveaux milieux, la culture prolongée a pris un essor considérable.

Selon les milieux et les conditions d'utilisation, le taux d'obtention des embryons jusqu'au stade de blastocyste s'échelonne largement dans la littérature entre 15% et 65% [9-10].

<b>Company</b>	Sequential media
<b>Cook IVF</b>	Sydney IVF cleavage medium/Sydney IVF blastocyst medium
<b>CooperSurgical</b>	Quinn's Advantage cleavage medium/Quinn's Advantage blastocyst medium
<b>FertiPro N.V.</b>	FERTICULT/FERTICULT G3
<b>InVitro Care Inc.</b>	IVC-ONE/IVC-TWO
<b>Irvine Scientific</b>	ECM/MultiBlast Medium
<b>Origio</b>	EmbryoAssist/BlastAssist et ISM1 ISM2
<b>Vitrolife</b>	G-1 v5 PLUS/G-2 v5PLUS

**Tableau I : Milieux séquentiels commercialisés pour la culture embryonnaire préimplantatoire**

- Emergence des milieux globaux

Le concept séquentiel a été remis en cause par certains et sont apparus des milieux dits globaux (Tableau II) permettant une culture avec le même milieu pendant 5 jours.

Plusieurs études suggèrent que l'utilisation d'un milieu global permettrait d'obtenir des taux de développement jusqu'au stade blastocyste équivalents par rapport aux milieux séquentiels [11].

<b>Company</b>	Medium
<b>IVFonline</b>	Global

**Tableau II : Milieux globaux commercialisés pour la culture embryonnaire préimplantatoire**

- Regain d'intérêt pour la co-culture : Protocole Endocell®

Par principe de précaution sanitaire, la Food and Drug Administration (FDA) et l'Agence de la Biomédecine (ABM) n'autorisent plus la co-culture qu'avec des lignées cellulaires autologues. Un nouveau procédé, Endocell®, constitue ainsi la première offre industrialisée de support de co-culture embryon-endomètre. Endocell® est un tapis de culture de cellules provenant de l'endomètre de la femme préalablement biopsiées dans l'utérus par le gynécologue. Chaque Endocell® est spécifiquement produit pour une seule femme. Ce procédé permettrait un meilleur développement embryonnaire et de meilleurs taux d'implantation et de grossesse [12].

## 1.2 Transfert embryonnaire

Le transfert embryonnaire possible du stade de zygote au stade de blastocyste consiste à déposer le(s) embryon(s) dans la cavité utérine à l'aide d'un cathéter. Il est souvent réalisé sous contrôle échographique. Dans notre centre, le transfert *in utero* des embryons « frais » est soit effectué au stade clivé à J2 ou J3 (cas le plus fréquent), soit à un stade de développement plus avancé, à J5 ou J6.

Les embryons évolutifs restant disponibles après le transfert « frais » sont appelés embryons surnuméraires, et si leur évolution est satisfaisante, sont congelés (le plus souvent au stade blastocyste).

Les embryons décongelés pourront être transférés lors d'un cycle ultérieur s'ils résistent au processus de congélation / décongélation, on parle alors de transfert d'embryon(s) congelé(s) (TEC).

## 1.3 Congélation embryonnaire

Dans le cadre de l'AMP, la loi permet au couple de consentir à ce que soit tentée la fécondation d'un nombre d'ovocytes pouvant rendre nécessaire la conservation d'embryons dans l'intention de réaliser ultérieurement leur projet parental (article L. 2141-3 du code de la santé publique), c'est-à-dire en vue d'une nouvelle tentative de transfert en cas d'échec ou d'une autre maternité ultérieure. Également et de façon plus anecdotique, la congélation de toute la cohorte embryonnaire permet de différer un transfert potentiellement dangereux chez des femmes hyperstimulées. Le syndrome d'hyperstimulation ovarienne (HSO) est la complication iatrogène la plus fréquemment rencontrée en FIV (1-5%), correspondant à une réponse ovarienne importante à la stimulation, dont l'ampleur est imprévisible. Il se manifeste par la présence d'ovaires de taille très augmentée et par une rétention hydrique parfois importante. Il s'observe dans la deuxième phase d'un cycle stimulé (phase lutéale) et peut être aggravé par un début de grossesse [13-14].

La congélation embryonnaire est utilisée maintenant depuis plus d'une vingtaine d'années [15]. Elle est possible à tous les stades du développement préimplantatoire. La première grossesse issue du transfert d'un embryon clivé congelé a été rapportée en 1983 [16] et en 1984 est survenue la première naissance après TEC d'un blastocyste [17].

La qualité de l'embryon est un élément essentiel dans la réussite de la congélation. On admet que les embryons présentant un haut degré de fragmentation, un clivage trop lent, ou un arrêt de développement doivent être écartés du stockage car ces embryons présenteraient un faible taux de survie et d'implantation après décongélation.

Deux techniques de congélation embryonnaire sont décrites : la congélation lente et la vitrification.

### **1.3.1 Congélation lente**

La congélation des embryons réalisée selon un protocole de congélation lente est la technique utilisée actuellement dans les centres d'AMP français. Elle nécessite de plonger l'embryon dans des bains successifs contenant les cryoprotecteurs à des concentrations croissantes : dans notre centre, propanediol et sucrose pour un embryon clivé (Embryo Freezing Pack<sup>®</sup>) ou glycérol et sucrose pour un blastocyste (BlastFreeze<sup>®</sup>) [18]. Une faible quantité de milieu contenant l'embryon est ensuite montée dans une paillette.

La congélation proprement dite est réalisée dans un appareil de congélation automatique. La cinétique de baisse en température comprend trois phases successives de refroidissement. La deuxième phase (-0,3 °C/min) est la plus délicate et correspond à la phase de formation de cristaux ; elle débute à -7°C et s'achève entre -30° et -40°C. Un seeding est réalisé à -7°C (induction de la cristallisation par apposition sur les paillettes d'une barre métallique préalablement refroidie dans l'azote liquide, limitant la variation de température au moment de la surfusion).

Les protocoles ne diffèrent pas pour la congélation des embryons clivés et des blastocystes, si ce n'est par la durée totale de congélation (1h45 et 2h10 respectivement). A la fin du cycle, lorsque la température atteint -150°C, les paillettes sont plongées dans l'azote liquide et stockées à -196°C.

En ce qui concerne la technique de décongélation, c'est une méthode de décongélation rapide. Les paillettes sont sorties de l'azote liquide, laissées à température ambiante pendant une minute puis passées quelques secondes au bain-marie à 30°C. Enfin, les embryons sont rincés successivement dans des bains de concentrations décroissantes en cryoprotecteurs (Origio : Embryo Thawing Pack<sup>®</sup> et BlastThaw<sup>®</sup>).

Le taux de survie embryonnaire après décongélation est variable en fonction des études. En ce qui concerne le blastocyste, il varie de 65% à 95% [19-20].

Le potentiel d'implantation des embryons congelés - décongelés varie considérablement en fonction des centres, mais les études s'accordent sur le fait qu'il est plus faible qu'après un transfert d'embryon « frais ». Pour les blastocystes, il varie de 11% à 43% [19-22], soit 2 à 3 fois moins qu'après transfert de blastocyste « frais » (32% à 44%) [23-25].

### **1.3.2 Vitrification**

La législation française autorise depuis septembre 2010 la vitrification des embryons humains (arrêté du 3 août paru au JO le 11 septembre 2010). Celle-ci est à présent reconnue comme une technique de congélation au même titre que la technique de congélation lente et ne nécessite pas d'autorisation particulière et peut être pratiquée dans les centres d'AMP qui le souhaitent. Elle doit, comme toutes les autres techniques d'AMP, être évaluée par l'ABM.

La technique de vitrification consiste à exposer les embryons pendant une très courte durée à des concentrations élevées de cryoprotecteurs avant de les refroidir de façon ultrarapide en les plongeant directement dans l'azote liquide. Ce processus induit la formation d'un état vitreux intra- et extracellulaire.

Au cours de ces dernières années, de nombreux articles relatifs à la vitrification des blastocystes ont été publiés avec des taux de survie variant de 73% à 86% et des taux de grossesses de 28% à 49% [26-27].

## 2 Revue de la littérature

### 2.1 Intérêt de la culture prolongée

Plusieurs avantages théoriques ont été avancés pour justifier un transfert embryonnaire au stade de blastocyste.

#### 2.1.1 Sélection des embryons

Il a été montré dans l'espèce humaine que l'expression du génome embryonnaire débutait majoritairement aux alentours du stade 8 cellules [4]. Par conséquent, les embryons qui atteignent le stade blastocyste ont franchi ce cap important alors que de nombreux embryons (environ la moitié) arrêteront leur développement précocement du fait d'anomalies chromosomiques ou de graves défauts dans leur programme de développement, imputables soit à une mauvaise maturation de l'ovocyte, soit à des perturbations de l'activation du génome embryonnaire [28]. Il a été rapporté des taux plus faibles d'aneuploïdie pour des embryons atteignant le stade blastocyste par comparaison avec des embryons dits de « top qualité » à J3 [29]. Sans bien évidemment améliorer la qualité embryonnaire *in vitro*, la culture prolongée peut permettre de sélectionner les embryons qui témoignent d'un certain potentiel de développement.

Par ailleurs, l'observation microscopique et la cotation sur des critères morpho-cinétiques des embryons après 2 à 3 jours de culture ont montré certaines limites. L'équipe de Guérif, en réalisant le suivi individuel de plus de 4000 embryons, a observé que la combinaison de plusieurs critères morphologiques précoces restait insuffisante pour prédire le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste [30]. Il est maintenant connu qu'une forte proportion d'embryons à J2-J3 de morphologie normale présente des anomalies chromosomiques responsable de 8% à 50% des échecs d'implantation [31-32]. Le fait donc de prolonger leur culture, permet d'optimiser le choix de l'embryon à transférer, par la visualisation de l'étape précédant le moment de l'implantation [33-34].



### 2.1.2 Condition d'implantation plus proche de la physiologie

L'implantation embryonnaire (ou nidation) est un processus complexe au cours duquel l'embryon humain s'appose d'abord à l'endomètre maternel, y adhère, puis finalement y pénètre et l'envahit. Elle est possible pendant une période très limitée appelée fenêtre implantatoire où l'endomètre offre une réceptivité maximale à l'embryon. Chez la femme, on pense que cette fenêtre dure à peu près 4 jours, du jour 20 au jour 24 d'un cycle menstruel normal [35].

L'hypothèse a été avancée, pour améliorer les taux d'implantation en AMP, de transférer l'embryon au stade blastocyste. Les couples avec des antécédents d'échec de FIV par défaut d'implantation embryonnaire pourraient constituer une bonne indication à la culture prolongée. Les arguments en faveur du transfert au stade blastocyste par rapport à un stade plus précoce de développement sont les suivants. *In vivo*, les embryons voyagent à travers les trompes de Fallope et n'atteignent pas l'utérus avant le stade de compaction cellulaire ou morula, équivalent à au moins 4 jours de culture *in vitro* [36]. Il semblerait donc physiologiquement plus naturel de transférer l'embryon à ce stade (Figure 3).

En effet, l'utérus et les trompes fournissent des nutriments différents adaptés à l'évolution embryonnaire. Par conséquent, le transfert embryonnaire dans une partie inhabituelle du tractus génital féminin par rapport à son stade effectif de développement pourrait être à l'origine d'un stress métabolique sur l'embryon et conduire à réduire son implantation potentielle [8].

Également, une étude de Valbuena met en évidence à partir d'un modèle *in vitro* les effets néfastes, sur l'embryon lui-même, des taux élevés d'œstrogènes, en particulier chez les femmes soumises à une hyperstimulation ovarienne. Il suggère que le transfert au stade de blastocyste réduirait le temps d'exposition des embryons aux forts taux d'estrogènes et améliorerait les taux d'implantation [37].

De plus, il a été observé que des contractions utérines plus fréquentes étaient associées à des taux réduits de grossesse et que ces contractions utérines décroissaient après l'injection d'hCG. Par conséquent, un transfert embryonnaire au stade blastocyste pourrait réduire le risque d'expulsion embryonnaire hors de la cavité utérine [38-39].

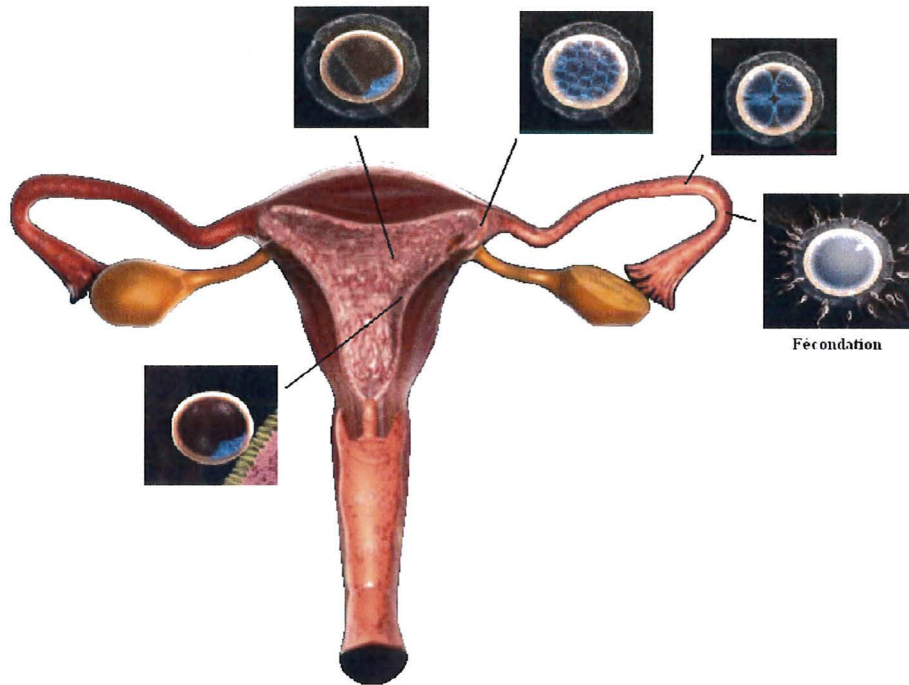


Figure 3 : Trajet physiologique de l'embryon dans les voies génitales féminines

### 2.1.3 Diminution du taux de grossesse multiple

La faible efficacité du transfert à J2-J3, dont les taux d'implantation situés entre 10% et 20% restent relativement modérés, incite souvent les praticiens à proposer des transferts avec plusieurs embryons. Cependant avec une telle stratégie, presque 20% des grossesses sont multiples : gémellaires ou d'ordre supérieur. Or, les grossesses multiples sont associées à une incidence accrue de morbidité et mortalité maternelle, néonatale et périnatale [40]. Ce problème de santé a fait l'objet, ces dernières années, en Europe et en France en particulier, d'une préoccupation croissante de la part des professionnels de l'AMP. En FIV, le transfert embryonnaire unique est la voie la plus efficace pour réduire les grossesses multiples multizygotiques.

Les blastocystes ayant une meilleure efficacité implantatoire, la culture prolongée jusqu'à ce stade permettrait de proposer le transfert d'un seul embryon (ou transfert mono-embryonnaire), tout en maintenant constant le taux de grossesse [9].

## **2.2 Inconvénients de la culture prolongée**

### **2.2.1 Annulations de transfert et/ou de congélation**

Le taux d'obtention de blastocyste par embryon à J3 est faible (< 50%), avec un taux de blastocyste « top qualité » lui aussi faible (< 25%), les risques sont donc de ne pas disposer d'embryon à transférer [41], et de diminuer le nombre d'embryons à congeler voire de ne pas avoir d'embryon à congeler [42-43].

Certains auteurs supposent que les milieux séquentiels utilisés habituellement pour la culture prolongée pourraient compromettre le potentiel implantatoire des blastocystes comparé à celui des embryons développés *in vivo* [44-45].

### **2.2.2 Augmentation de la fréquence des gémellités monozygotiques**

Il nous semble intéressant de rapporter ici une conséquence, à priori inattendue, des transferts embryonnaires au stade blastocyste : l'augmentation des grossesses gémellaires monozygotes observée depuis la réalisation de transferts embryonnaires au stade blastocyste [46]. Ce risque non négligeable mais difficile à chiffrer est lié à la segmentation *in utero* du blastocyste transféré [47]. En procréation naturelle le taux de gémellarité monozygote est évalué à 1/300 naissances, après AMP le taux s'élève à environ 1% [48].

Ce taux pourrait dépendre des conditions de culture, notamment des milieux utilisés. Pour ce qui concerne la culture sur milieux séquentiels, l'une des hypothèses avancées attribue ce phénomène aux facteurs de croissance contenus dans ces milieux de culture. Une autre hypothèse implique les micromanipulations susceptibles d'altérer le trophoctoderme, induisant ainsi un hatching (ou éclosion) prématuré du blastocyste.

### 2.2.3 Déséquilibre du sex-ratio

Une tendance au déséquilibre du sex-ratio en faveur des garçons a été retrouvée dans huit études mais une seule a publié des résultats significatifs (Tableau III).

Études	M/F (%) TE à J3	M/F (%) TE blasto.	p-value
Meintjes 2001 [49]	40/24 (62,5/37,5)	234/168 (58,2/41,8)	ns
Rodriguez 2001 [50]	49/51 (49/51)	47/35 (57,3/42,7)	ns
Anderson 2001 [51]	108/95 (53,2/46,6)	83/67 (55,3/44,7)	ns
Mercader 2001 [52]	326/321 (50,4/49,9)	81/44 (64,8/35,2)	p = 0.003
Wilson 2002 [53]	128/134 (48,9/51,1)	163/143 (53,2/46,8)	ns
Kausche 2001[54]	169/168 (50,1/49,9)	92/71 (56,4/43,6)	ns
Milki 2003 [55]	157/139 (53/47)	97/66 (59,5/40,5)	ns
Lin 2010 [56]	71/47 (60,2/39,8)	190/165 (53,5/46,5)	ns

**Tableau III : Sex-ratio des enfants issus d'un transfert de blastocyste ou d'embryon clivé à J3**

### 2.3 Comparaison des résultats après transfert « frais » (stade clivé *versus* stade blastocyste)

Le bénéfice clinique de la culture prolongée n'est pas, à ce jour, clairement démontré dans la littérature, notamment en considérant le taux cumulé de grossesses (après transfert d'embryons « frais » et après décongélation). Il ne nous apparaît pas pertinent de proposer une culture prolongée systématique, d'emblée, dans une population infertile non-sélectionnée.

Une méta-analyse publiée en 2007 recense dix-sept études randomisées prospectives comparant les taux de succès après transfert embryonnaire au stade précoce J2-J3 *versus* au stade tardif J5-J6, et ce dans différents types de population [57]. Les études randomisées prospectives incluant des patientes de bon pronostic, concluent de façon quasi-consensuelle à un effet bénéfique de la culture prolongée (Tableau IV). Dans les cas de patientes peu sélectionnées, les études randomisées prospectives ne trouvent pas d'effet bénéfique majeur (Tableau V) et chez des patientes de mauvais pronostic, il n'y aurait pas de bénéfice à faire de la culture prolongée (Tableau VI).

Études	Population	Stade clivé				Blastocyste			
		Effectif	Nb ET	TI (%)	TG (%)	Effectif	Nb ET	TI (%)	TG (%)
Papanikolaou 2006 [24]	<36 ans Rang 1 ou 2 FSH<12	176	1	24	21,6 (Acc)	175	1	38,9	32 (Acc)
Papanikolaou 2005 [58]	<37 ans, Rang ≤3 ≥4 emb à ≥6 cell A ou B	84	2,0	20,6	27,4	80	1,97	37,3	51,3
Fratarelli 2003 [59]	<35 ans, Rang 1 ≥10 foll de ≥14mm	23	2,96	26,1	43,5	26	2,04	43,4	69,2 p=0,07
Levron 2002 [60]	<38 ans >5 emb à 2PN	44	3,1	38,7	45,5	46	2,3	20,2	18,6 p<0,01
Karaki 2002 [61]	≥5 emb à 2PN	82	3,5	12,7	26	80	2,0	26,1	29 p<0,01
Gardner 1998 [62]	>10 foll de >12mm	47	3,7	36,8	66	45	2,2	55,8	71 p<0,01
Rienzi 2002 [63]	<38ans ≥8 PN en ICSI	48	2	35	56	50	2	38	58 ns

**Tableau IV : Résultats des études randomisées prospectives incluant des patientes de bon pronostic**  
**Nb ET : Nombre moyen d'embryon(s) transféré(s). TI : Taux d'implantation embryonnaire. TG : Taux de grossesses par transfert**

Auteurs	Population	Stade clivé				Blastocyste			
		Effectif	Nb ET	TI (%)	TG (%)	Effectif	Nb ET	TI (%)	TG (%)
Kolibianakis 2004 [43]	<43 ans	234	1,9	41	32,1	226	1,8	41,6	33,2
Hreinsson 2004 [64]	≥ 6 foll	80	1,8	20,9	36,7	64	1,9	21,1	32,5
Bungum 2003[65]	<40 ans FSH<12 >2 8 cell A ou B	57	2,0	43,9	61	61	1,97	36,7	51
Emiliani 2003 [66]	<39 ans (J2)	89	2,1	28,9	49	82	1,9	29,8	44
Van der Auwera 2002 [67]	All (J2)	63	1,86	29,2	32	66	1,87	45,6	44 p<0,05
Coskun 2000 [68]	≥ 4 2PN	101	2,3	21,3	39	100	2,2	23,9	39 ns

**Tableau V : Résultats des études randomisées prospectives incluant des patientes peu sélectionnées**

Auteurs	Population	Stade clivé				Blastocyste			
		Effectif	Nb ET	TI (%)	TG (%)	Effectif	Nb ET	TI (%)	TG (%)
Levitas 2004 [69]	<37ans, Rang $\geq 4$ avec réponse correcte	31	3,4	6	12,9	23	1,9	21,2	21,7
Utsonomiya 2002 [10]	Tous (mais Rang moyen >5)	121	2,9	11,7	26,3	114	3,0	9,2	24,9 ns
Guerif 2004 [70]	Rang $\geq 3$ avec au moins 2 emb score I ou II	147	2,0	12,4	22,4	129	1,7	25,4	34,1

**Tableau VI : Résultats des études randomisées prospectives incluant des patientes de mauvais pronostic**

La difficulté réside dans la sélection des couples candidats à la culture prolongée, c'est-à-dire les couples dits de bon pronostic. Une analyse fine de l'étude de Blake nous montre que le taux de naissance par transfert embryonnaire « frais » est significativement supérieur après culture prolongée uniquement lorsque la randomisation était faite à J2-J3, c'est-à-dire lorsque de nombreux embryons de bonne qualité étaient disponibles au stade précoce. En revanche, le bénéfice attribué à la culture prolongée était plus relatif lorsque la randomisation était décidée plus en amont, au début de la stimulation ovarienne voir à J0 ou J1 de la tentative de FIV. La décision des biologistes sur le jour optimal du transfert embryonnaire « frais » devrait être faite à J2-J3 en concertation avec le couple. Une corrélation positive existe entre le nombre de blastocystes obtenu et le nombre d'embryons à 8 cellules au troisième jour de développement [71]. Racowsky suggère comme candidat au transfert « frais » de blastocyste les couples avec plus de 3 embryons à 8 cellules à J3 [45].

## 2.4 Intérêt de la congélation après culture prolongée

L'évaluation de la congélation au stade de blastocyste a fait l'objet d'une étude analytique rétrospective des données du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Grenoble. La revue de la littérature sera abordée dans la discussion. Ce travail sera soumis prochainement à publication.

# PUBLICATION

## INTRODUCTION

La congélation des embryons surnuméraires est réalisée en vue d'améliorer les chances de succès de la FIV pour le couple. Également et de façon plus anecdotique, la congélation de toute la cohorte embryonnaire sera entreprise en cas de risque de syndrome d'hyperstimulation. Cette technique est réalisée depuis plus d'une vingtaine d'années. Le premier embryon humain congelé au stade blastocyste et dont le transfert a abouti à une grossesse date de 1984 [17]. Depuis, les pratiques de culture et de congélation ont évolué. Selon l'Agence de la Biomédecine (ABM), plus de 16 000 Transferts d'Embryons Congelés (TEC) ont eu lieu en 2008. Il est donc impératif d'améliorer les protocoles de cryoconservation afin d'optimiser les chances de grossesses.

La congélation des embryons peut être réalisée à tous les stades embryonnaires. A quel stade est-il préférable de congeler les embryons et quel est l'intérêt représenté par les transferts additionnels des embryons congelés au stade de blastocyste ? L'analyse de la littérature n'apporte pas de réponse claire à cette question, il nous a semblé nécessaire d'évaluer notre pratique au Centre d'Aide à la Procréation du CHU de Grenoble par une étude rétrospective des données du centre sur une durée de cinq ans (de 2005 à 2009).

Dans une première partie seront analysés de façon exhaustive les transferts d'embryons congelés réalisés entre 2005 et 2009 avec une comparaison des résultats en fonction du stade de congélation, stade clivé *versus* blastocyste. Nous affineront cette évaluation dans une deuxième partie en analysant les taux cumulés de grossesse (après transfert « frais » et transferts des embryons congelés) dans ces deux stratégies de congélation embryonnaire.

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

## 1. Généralités sur la pratique du centre

Dans notre centre, la congélation au stade blastocyste a débuté en 2005 et n'a cessé de prendre de l'importance ces dernières années pour atteindre un plateau dès 2007 de l'ordre de 64% des cycles de congélation. Les débuts timides de la congélation au stade de blastocyste en 2005 et 2006 étaient nécessaires pour maîtriser la technique et obtenir le recul nécessaire à l'évaluation de la pratique. La première grossesse après TEC de blastocyste survenue le 4 février 2006, a conforté l'équipe pluridisciplinaire. Par conséquent, la congélation au stade de blastocyste est depuis 2007 largement privilégiée. Elle est effectivement réalisée si les conditions techniques sont réunies en termes d'évolution des embryons (au moins un embryon surnuméraire congelable) et d'organisation du laboratoire (non réalisation des congélations les dimanches et jours fériés). Si certaines congélations ont encore lieu au stade clivé, c'est en majorité dû à des impératifs organisationnels de notre laboratoire et en particulier sont exclues les tentatives pour lesquelles la congélation au stade de blastocyste tomberait un dimanche (ponction ovocytaire du mardi) ou un jour férié.

La proportion des congélations au stade de blastocyste s'est stabilisée depuis 2007, nous avons volontairement choisi d'analyser les données de 2005 à 2009 afin d'augmenter la puissance statistique de nos résultats, après nous être préalablement assurés que les résultats obtenus sur la période de recrutement 2005 - 2009 étaient les mêmes que sur la période 2007 - 2009.

Les couples inclus dans l'étude ont bénéficié d'une prise en charge intraconjugale ou avec tiers-donneurs de spermatozoïdes en AMP de type FIV avec ou sans ICSI. Leurs consentements éclairés pour la cryoconservation et l'utilisation des embryons congelés ont préalablement été obtenus.

Les couples ayant eu un transfert d'embryon « frais » ou un TEC au 4<sup>ème</sup> jour de développement (n=4) ont été exclus de l'étude.

La stimulation ovarienne a été réalisée le plus souvent selon un protocole long / agoniste : blocage de l'ovulation par un agoniste de la GnRH (Gonadotropin Releasing



Hormone), stimulation de la croissance folliculaire par des hormones mimant l'effet des hormones hypophysaires : FSH (Follicle Stimulating Hormone) ± LH (Luteinizing Hormone) et déclenchement de l'ovulation par l'hCG (human Chorionic Gonadotropin). La ponction de follicules ovariens, effectuée sous anesthésie générale ou locale, avait lieu 36 heures après le déclenchement de l'ovulation. Les ovocytes recueillis ont été mis en fécondation soit de façon conventionnelle soit par ICSI.

La culture des embryons avait lieu dans le milieu ISM1<sup>TM</sup> (Origio) jusqu'au troisième jour puis dans le milieu ISM2<sup>TM</sup> adapté pour la culture prolongée, à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>.

La majorité des transferts « frais » a été réalisée au stade clivé (les transferts « frais » au stade de blastocyste ne représentent que 10% des transferts). Après avoir choisi pour le transfert « frais », le(s) embryon(s) présentant les meilleures caractéristiques morphologiques et cinétiques, les embryons surnuméraires viables restants ont pu être congelés à J2, J3, J5 ou J6. Lorsqu'un transfert « frais » avait lieu au stade de blastocyste, tous les éventuels embryons surnuméraires ont été congelés à ce stade.

Les embryons surnuméraires ont été congelés selon un protocole lent utilisant comme cryoprotecteurs respectivement du propanediol et du sucrose pour les embryons clivés (Embryo Freezing Pack<sup>®</sup>) et du glycérol et du sucrose pour les blastocystes (BlastFreeze<sup>®</sup>). La cinétique de descente en température est la même pour les deux stades embryonnaires, seule change la durée totale de congélation (1h45 pour les embryons clivés et 2h10 pour les blastocystes) [18].

Une légère stimulation ovarienne et un déclenchement de l'ovulation (hCG) a souvent été réalisée avant le TEC.

## **2. Recueil de données**

Pour chaque tentative, les informations suivantes ont été recueillies :

### **Informations sur le couple**

- Numéro de dossier
- Nom et prénom des conjoints
- Dates de naissance des conjoints

**Informations sur la ponction**

- Date de la ponction folliculaire
- Rang de la tentative
- Technique utilisée
- Nombre d'ovocyte(s) recueilli(s)
- Nombre d'ovocyte(s) inséminé(s) ou microinjecté(s)
- Nombre total d'embryon(s) obtenu(s)
- Nombre d'embryon(s) mis en culture prolongée

**Informations sur le transfert « frais » et la congélation**

- Nombre d'embryon(s) transféré(s)
- Stade du(es) embryon(s) transféré(s)
- Date et jour du transfert
- Nombre total d'embryon(s) congelé(s)
- Stade du(es) embryon(s) congelé(s)
- Date et jour de la congélation

**Informations sur le résultat du transfert d'embryons « frais »**

- Résultat de la FIV
- Nombre de sac(s) à l'échographie
- Devenir des grossesses au 1<sup>er</sup> trimestre (grossesse évolutive et nombre de sacs à l'échographie, grossesse extra-utérine, interruption médicale de grossesse)
- Issue de la grossesse (Accouchement, fausse-couche du 2<sup>ème</sup> trimestre ou interruption médicale de grossesse)
- Nombre d'enfant(s) né(s) vivant(s)
- Sexe du(es) enfant(s)

**Informations sur la décongélation**

- Nombre d'embryon(s) décongelé(s) intact(s)
- Stade du(es) embryon(s) décongelé(s)
- Date de décongélation
- Nombre d'embryon(s) décongelé(s) ayant une survie positive

### **Informations sur le transfert embryonnaire après décongélation**

- Nombre d'embryon(s) transféré(s)
- Stades du(es) embryon(s) transféré(s)
- Date et jour du transfert

### **Informations sur le résultat du transfert embryonnaire après décongélation**

- Résultat du TEC
- Nombre de sac(s) à l'échographie
- Devenir des grossesses au 1er trimestre (grossesse évolutive et nombre de sacs à l'échographie, grossesse extra-utérine, interruption médicale de grossesse)
- Issue de la grossesse (Accouchement, fausse-couche du 2<sup>ème</sup> trimestre ou interruption médicale de grossesse)
- Nombre d'enfant(s) né(s) vivant(s)
- Sexe du(es) enfant(s)

## **3. Caractéristiques des couples inclus**

Dans la première partie, les données globales des 1022 décongélation embryonnaires (533 couples) réalisés entre 2005 et 2009 ont été analysées. Deux groupes de comparaison ont été définis : les TEC réalisés à J2 ou J3 (n=621) et les TEC réalisés à J5 ou J6 (n=279).

Les critères d'évaluation retenus sont pour le TEC :

- Le **taux d'annulations de transfert** : nombre de tentatives pour lesquelles le transfert embryonnaire n'a pas pu être réalisé (survie négative à la décongélation, arrêt de développement) sur le nombre total de transferts programmés.
- Le **nombre moyen d'embryons transférés** par transfert.
- Le **taux de grossesses cliniques** par transfert : nombre de grossesses confirmées par transfert. La grossesse clinique est définie soit par un dosage de  $\beta$ HCG supérieur ou égal à 1000UI/ml quinze jours après le transfert, soit par la présence d'un ou plusieurs sacs embryonnaires intra-utérins à l'échographie.
- Le **taux d'accouchements** par transfert.
- Le **taux de grossesses multiples** par grossesse.
- Le **taux de fausses couches** par grossesse.
- Le **taux d'accouchements multiples** par accouchement.

Et les critères d'évaluation retenus pour l'embryon sont :

- Le **taux de survie après décongélation** : nombre d'embryons ayant un index de survie positif sur le nombre total d'embryons décongelés.

Une survie positive d'un embryon au stade précoce est définie par la présence d'au moins 50% des blastomères intacts après décongélation.

Une survie positive ou un index de survie de 100% d'un blastocyste est déterminé par un aspect morphologique intact et une capacité de ré-expansion du blastocoele *in vitro* en quelques heures.

- Le **taux d'implantation** : nombre d'embryons implantés (nombre de sacs avec activité cardiaque à l'échographie) rapporté au nombre d'embryons transférés.

Dans la deuxième partie de l'étude, ont été inclus les couples ayant eu une ponction folliculaire entre 2005 et 2009 avec congélation d'embryons surnuméraires. Pour plus de rigueur et obtenir des populations comparables, ont été ajoutées les tentatives pour lesquelles la mise en culture prolongée des embryons surnuméraires a abouti à une annulation de congélation.

Ont été exclues les tentatives pour lesquelles des embryons ont été congelés à différents stades (n=5).

Ainsi, notre population est composée de 1008 tentatives réparties en 2 groupes.

Groupe 1 (n<sub>1</sub>=411) : Le groupe de comparaison « sans culture prolongée » pour lequel les couples ont bénéficié de transferts d'embryons « frais » et TEC au stade précoce, à J2 ou J3.

Groupe 2 (n<sub>2</sub>=597): Le groupe d'évaluation « avec culture prolongée » pour lequel les couples ont bénéficié d'une mise en culture prolongée de leurs embryons aboutissant ou non à une congélation. En ce qui concerne le transfert d'embryons « frais », celui-ci a pu être réalisé au stade précoce ou au stade de blastocyste.

Le critère d'évaluation pris en compte est le **taux cumulé de grossesses par tentative** : nombre de grossesses par tentative, c'est-à-dire après le transfert d'embryon(s) « frais » et le(s) TEC issu(s) de toute la cohorte embryonnaire d'une ponction.

#### **4. Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type pour les variables quantitatives et en pourcentage pour les variables qualitatives.

La comparaison de deux pourcentages observés dans des groupes distincts a été réalisée par un test non paramétrique bilatéral de Khi-2, à condition que chaque effectif théorique ait été  $>5$ . La comparaison de deux moyennes a été réalisée à l'aide d'un test paramétrique dit de Student (t-test). On a considéré que la variable étudiée était répartie selon une loi normale de moyenne  $\mu$  et de variance  $\sigma$  si les effectifs des échantillons étaient  $> 30$ .

Le seuil de significativité a été fixé à 5% ( $p < 0.05$ ).

## RÉSULTATS

### Évolution de la proportion des congélations embryonnaires au stade de blastocyste

À titre indicatif, au CHU de Grenoble, entre février 2005 et décembre 2009, 1943 tentatives de FIV (ou ponctions ovocytaires) ont eu lieu au laboratoire et 37.9% (732) des ces tentatives avaient des embryons disponibles pour la congélation.

La congélation embryonnaire au stade de blastocyste a débuté en 2005 puis s'est régulièrement développée en 2006 - 2007. Depuis 2007, la proportion des congélations au stade de blastocyste est devenue majoritaire et a atteint un équilibre entre 62% et 67% des cycles de congélation (figure 4).

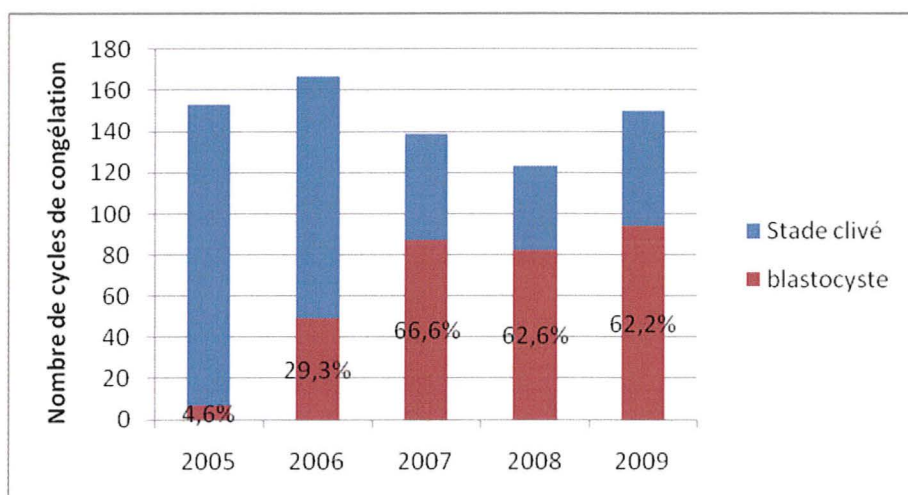


Figure 4 : Évolution annuelle du nombre de cycles de congélation embryonnaire. Les étiquettes de valeurs représentent la part des congélations au stade de blastocyste

## Première partie : Analyse des données des transferts d'embryon(s) congelé(s)

### 1. Évolution annuelle du nombre de TEC

De début 2005 à fin 2009, 1022 décongelations embryonnaires ont été programmés au CHU de Grenoble et 900 transferts ont effectivement été réalisés (11,9% annulations de transfert). Ces embryons étaient issus de 636 ponctions ovocytaires.

Ces 900 TEC ont été divisés en deux groupes de comparaison : le groupe d'étude composé des transferts de blastocyste ( $n_{\text{TEC blastocyste}}=279$ ) et le groupe composé des transferts d'embryon clivé ( $n_{\text{TEC embryon clivé}}= 621$ ).

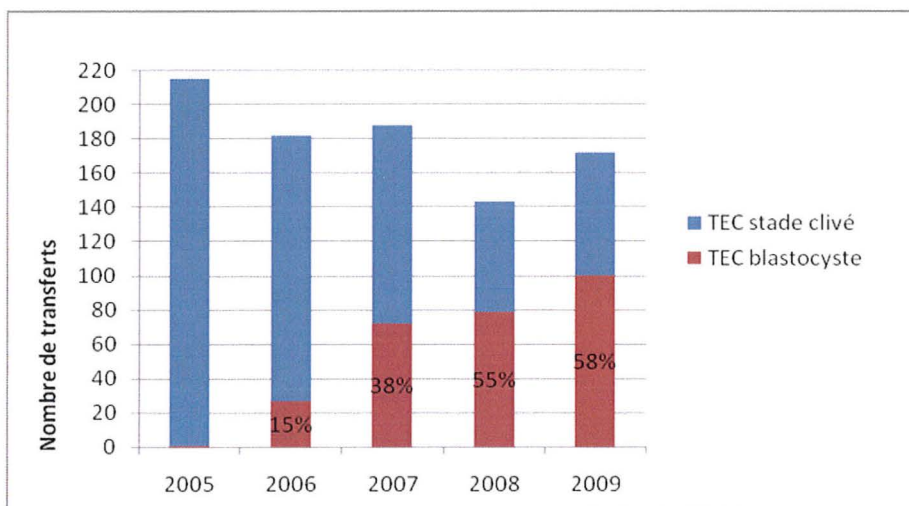


Figure 5 : Évolution annuelle du nombre de TEC. Les étiquettes de valeurs représentent la part de TEC « blastocyste » par rapport à la totalité des TEC

Depuis 2005, nous constatons une augmentation régulière de la proportion des TEC au stade de blastocyste. A noter que cette figure ne prend pas en compte les annulations de transfert (figure 5).

Les caractéristiques démographiques et cliniques des deux groupes de comparaison (« TEC stade clivé » et « TEC blastocyste ») sont rapportées dans le tableau VII. Ces deux populations sont comparables et ne présentent pas de différence significative sur le plan de l'âge des patients et du rang de tentative de la FIV.

	<b>TEC stade clivé</b>	<b>TEC blastocyste</b>	<b>P-value</b>
Age moyen femmes (années)	32,2 ± 4,3	31,6 ± 4,9	0,06
Age moyen hommes (années)	34,9 ± 5,2	35,0 ± 4,9	0,9
Rang moyen tentative	1,8 ± 1,0	1,6 ± 0,8	0,4

**Tableau VII : Comparaison de l'âge des patients et du rang de la tentative**

Les caractéristiques des tentatives de FIV dont sont issus les TEC sont rapportées dans le tableau VIII. Nous n'avons pas observé de différence significative dans la répartition de FIV conventionnelle / ICSI, dans le nombre moyen d'ovocytes recueillis et inséminés et dans le nombre moyen d'embryons obtenus à J2-J3.

On considère que nos deux populations sont comparables.

	<b>TEC stade clivé</b>	<b>TEC blastocyste</b>	<b>P-value</b>
% FIV conventionnelle	38,3	41,6	0,4
Nombre moyen d'ovocytes recueillis	14,6 ± 6,7	13,7 ± 6,3	0,08
Nombre moyen d'ovocytes inséminés	13,0 ± 5,8	12,5 ± 5,9	0,3
Nombre moyen d'embryons à J2-J3	10,0 ± 4,5	9,6 ± 4,8	0,2
Nombre moyen d'embryons transférés	1,5 ± 0,7	1,4 ± 0,6	< 0,01

**Tableau VIII : Comparaison des caractéristiques des tentatives de FIV**



## 2. Annulations de transfert

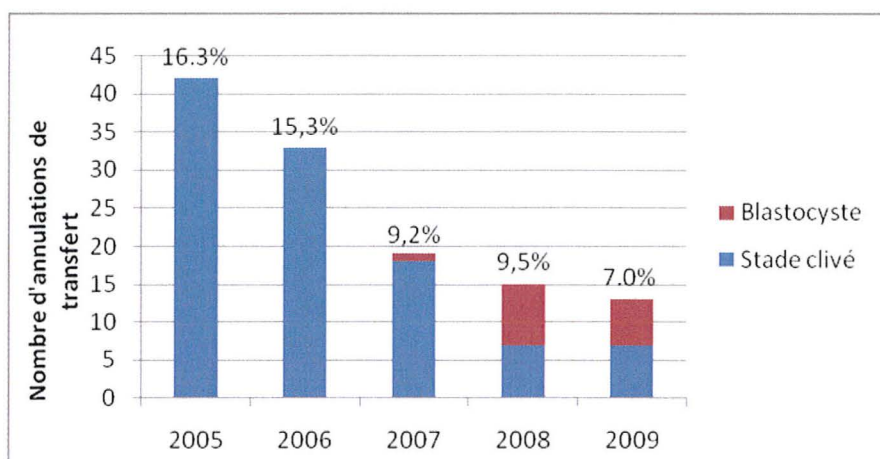


Figure 6 : Évolution annuelle du nombre d'annulations de transfert embryonnaire après décongélation. Pourcentages d'annulations de transfert

En 2005 et 2006, les annulations de transfert sont toutes survenues après décongélation d'embryons clivés et représentaient 15,8% des TEC programmés au départ. Après 2007, on observe une diminution des annulations de transferts qui ne représente plus qu'en moyenne 8.5% des TEC programmés.

Globalement, ces échecs de transferts sont dus soit à une survie négative à la décongélation (55.7%), soit à un arrêt de maturation pour les embryons décongelés à J2 et cultivé jusqu'à J3 (33.7%), soit les rares cas où des embryons ont été décongelés au stade clivé et mis en culture prolongée jusqu'à J5-6 (4.9%) ou les très rares cas où des embryons ont été décongelés à J5 et mis en culture jusqu'à J6 pour un transfert programmé sous anesthésie générale (1.6%).

## 3. Taux de survie embryonnaire après décongélation

	Embryon clivé	blastocyste	
Taux de survie (%)	<b>80,9</b>	<b>89,6</b>	P < 0.01

Tableau IX : Taux de survie embryonnaire après décongélation

Le taux de survie d'un blastocyste après un cycle de congélation / décongélation est excellent. Il est significativement plus élevé que le taux de survie d'un embryon clivé (89,6% *versus* 80,9%).

#### 4. Grossesses et issues de grossesses après TEC

##### Évolution du nombre de grossesses et d'accouchements

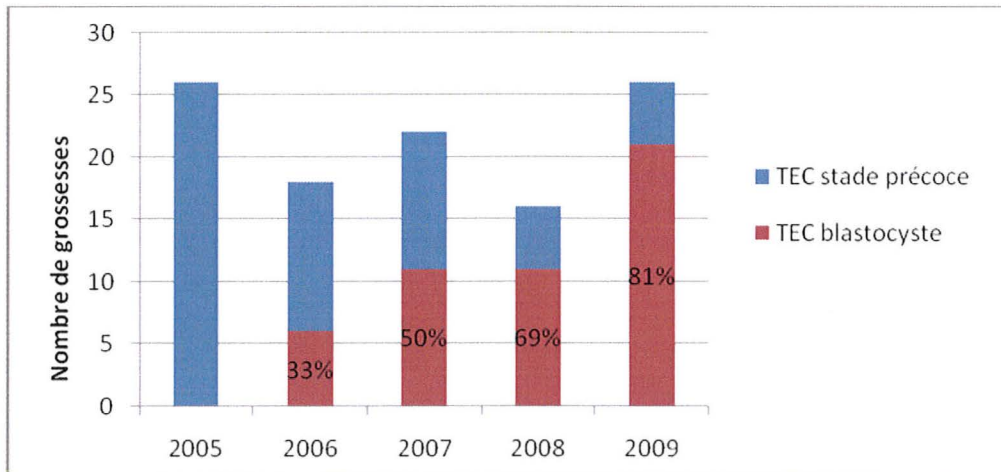


Figure 7 : Évolution du nombre de grossesses cliniques. Les étiquettes de valeurs représentent la part des grossesses imputables aux TEC « blastocyste »

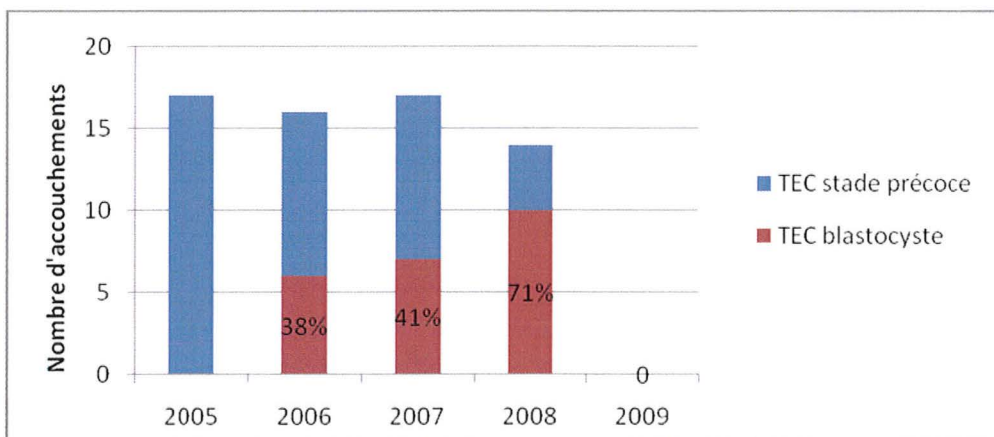


Figure 8 : Évolution du nombre d'accouchements. Les étiquettes de valeurs représentent la part des accouchements suite aux TEC « blastocyste ». Les données de 2009 sont non interprétables (issues de grossesses non exhaustives)

L'augmentation de la proportion de grossesses et d'accouchements imputables aux TEC « blastocystes » suit naturellement l'augmentation de la proportion des transferts à ce stade.

## Taux de grossesses et d'accouchements par TEC

	TEC au stade clivé (n=621)	TEC au stade blastocyste (n=279)		Total (n=900)	ABM 2008
Nombre de TEC	621	279		900	/
Taux de grossesses cliniques (%)	<b>9,5</b> (59/621)	<b>17,6</b> (49/279)	P < 0,01	<b>12,0</b>	<b>16,9</b>
Taux d'accouchements (%) <i>(calculés sur les données de 2005 à 2008)</i>	<b>7,5</b> (41/549)	<b>12,8</b> (23/179)	P < 0,01	<b>8,8</b>	<b>12,2</b>

**Tableau X : Taux de grossesses et taux d'accouchements par TEC. Les taux d'accouchements sont calculés à partir des données de 2005 à 2008 (données des issues de grossesses non exhaustives en 2009)**

Afin d'évaluer l'impact de notre politique de transfert, nos résultats ont été comparés aux données de l'ABM. Ces données de l'ABM sont issues du rapport annuel de l'agence relatif à l'activité de transfert d'embryon congelé, en intraconjugal, publié en 2009 (données de 2008) [1]. Les taux globaux de grossesses cliniques et d'accouchements par TEC au centre d'AMP du CHU de Grenoble paraissent inférieurs à la moyenne nationale (12% *versus* 16,9% et 8,8% *versus* 12,2%).

Par ailleurs, les taux de grossesses et d'accouchements par TEC sont significativement supérieurs après transfert de blastocyste par rapport au transfert d'un embryon clivé (17,6% *versus* 9,5% et 12,8% *versus* 7,5% ; p < 0,01).

## 5. Nombre d'embryon(s) transféré(s) par TEC

	TEC au stade clivé (n=621)	TEC au stade blastocyste (n=279)		Total (n=900)	ABM 2008
Nombre moyen d'embryons transférés	1,4 ± 0,5	<b>1,3 ± 0,45</b>	P < 0,01	<b>1,3 ± 0,45</b>	<b>1,7</b>

Tableau XI : Nombre moyen d'embryon transféré par TEC

Les praticiens du CHU de Grenoble ont tendance à transférer moins d'embryon que les autres centres nationaux (1,3 *versus* 1,7) [1].

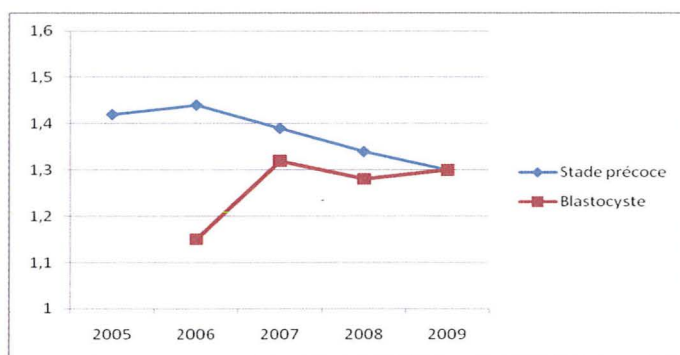


Figure 9 : Évolution du nombre moyen d'embryon transféré par TEC

Par ailleurs, le nombre moyen d'embryon transféré au stade clivé et au stade de blastocyste tend vers 1,3.

## 6. Taux d'implantation embryonnaire après TEC

	TEC au stade clivé	TEC au stade blastocyste		Total	ABM 2008
Nombre d'embryons transférés	870	357		1227	
Nombre d'embryons implantés	61	54		115	/
Taux d'implantation (%)	<b>7,0</b>	<b>15,1</b>	P < 0,01	<b>9,4</b>	<b>10,3</b>

Tableau XII : Taux d'implantation embryonnaire après TEC

Le taux global d'implantation de 9,4% est comparable au taux d'implantation après TEC en intraconjugal publié annuellement par l'ABM, soit 10,3% pour l'année 2008 [1].

Le taux d'implantation des blastocystes de 15,1% est significativement supérieur au taux d'implantation des embryons clivés de 7%.

## 7. Taux de grossesses multiples et taux de fausses couches après TEC

	TEC au stade clivé	TEC au stade blastocyste		Total	ABM 2008
Nombre de grossesses	59	49	P = 0,3	108	/
Taux de grossesses gémellaires (%)	<b>3,4</b> (2/59)	<b>10,2</b> (5/49)		<b>6,5</b>	/
Taux d'accouchement multiples (%) <i>(calculés sur les données de 2005 à 2008)</i>	2,4 (1/41)	8,7 (2/23)		<b>4,7</b>	<b>10,1</b>

**Tableau XIII : Taux de grossesses gémellaires et taux d'accouchements multiples après TEC. Le taux d'accouchements multiples est calculé à partir des données de 2005 à 2008 (données des issues de grossesses non exhaustives en 2009)**

Sur la période étudiée, on observe uniquement 2 grossesses gémellaires après transferts d'embryons clivés et 5 suite aux transferts de blastocystes ; les taux de grossesses multiples ne sont pas significativement différents dans les 2 groupes (3,4% *versus* 10,2%).

Ces grossesses gémellaires étaient toutes hétérozygotes.

De plus, les taux d'accouchements multiples du centre ont tendance à être plus faible que la moyenne nationale (4,7% *versus* 10,1%) [1].

Il est important de souligner qu'aucune grossesse triple n'est survenue dans notre centre durant la période étudiée.

	TEC au stade clivé	TEC au stade blastocyste		Total	ABM 2008
Taux de fausses couches (%) <i>(calculés sur les données de 2005 à 2008)</i>	24,1 (13/54)	<b>17,8</b> (5/28)	P = 0,7	<b>21,9</b>	<b>27,5</b>

**Tableau XIV : Taux de fausses couches après TEC, calculé à partir des données de 2005 à 2008 (données des issues de grossesses non exhaustives en 2009)**

Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les taux de fausses couches après TEC de blastocyste et TEC au stade précoce (17,8% *versus* 24,1%).

## 8. Analyses des résultats

### Influence de la technique utilisée

La technique de FIV utilisée (FIV conventionnelle ou ICSI) n'influence pas les taux de survie des embryons. Le taux de grossesses cliniques par TEC a tendance à être supérieur après ICSI (11,8% contre 8,6% pour la FIV) mais aucune différence significative n'a été mise en évidence ( $p=0,15$ ). Cette tendance se retrouve après transfert d'embryons au stade précoce et au stade de blastocyste.

### Influence du jour de congélation des blastocystes

	Blastocyste à J5	Blastocyste à J6	
Taux de grossesses cliniques (%)	<b>18,1</b> (37/204)	<b>16,0</b> (12/75)	P = 0,8
Taux d'implantation (%)	<b>15,5</b> (42/271)	<b>17,6</b> (12/86)	P = 0,9

**Tableau XV : Influence du jour de congélation du blastocyste sur les taux de grossesses et les taux d'implantation après TEC**

Il n'existe pas de différence significative entre les taux de grossesses cliniques après TEC d'un blastocyste congelé à J5 ou J6 (18,1% *versus* 16%) ni de différence entre les taux d'implantation d'un blastocyste congelé à J5 ou J6 (15,5% *versus* 14%).

### Influence du nombre d'embryons transférés

	TEC au stade clivé		TEC au stade blastocyste	
	1	2	1	2
Nombre de TEC	375	246	201	78
Taux de grossesses (%)	<b>9,9</b> (37/375)	<b>8,9</b> (22/246)	<b>14,4</b> (29/201)	<b>25,6</b> (20/78)
Taux de grossesses multiples (%)	0	<b>9,1</b> (2/22)	0	<b>25</b> (5/20)

**Tableau XVI : Influence du nombre d'embryons transférés sur les taux de grossesses cliniques et sur les taux de grossesses multiples après TEC**

La proportion des TEC avec transfert de 2 embryons au CHU de Grenoble est de 36% (324/900) ; et est largement plus faible que la moyenne nationale de 59,6% [1]. Le taux de grossesses cliniques après transfert de 2 blastocystes décongelés est significativement plus élevé qu'après transfert d'un seul blastocyste (25,6% contre 14,4% ;  $p = 0,04$ ).

## Deuxième partie : Résultats des taux cumulés de grossesses

Il est intéressant, afin d'évaluer l'intérêt de la congélation des embryons surnuméraires au stade de blastocyste, d'étudier les résultats cumulés de tous les transferts (embryons « frais » et embryons congelés) issus d'une même tentative (ou ponction).

Ainsi, sur la période 2005 - 2009, nous avons extrait notre population composée de 1008 tentatives réparties en 2 groupes.

**Groupe 1 (n<sub>1</sub>=411)** : Le groupe de comparaison « sans culture prolongée » pour lequel les couples ont bénéficié de transferts d'embryons « frais » et TEC au stade précoce, à J2 ou J3.

**Groupe 2 (n<sub>2</sub>=597)** : Le groupe d'évaluation « avec culture prolongée » pour lequel les couples ont bénéficié d'une mise en culture prolongée de leurs embryons aboutissant ou non à une congélation. En ce qui concerne le transfert d'embryons « frais », celui-ci a pu être réalisé au stade précoce ou au stade de blastocyste.

n = 597

- 316 : blastocystes surnuméraires congelés (52,9%)
- 281 : pas d'embryon congelable à J5-J6 (47,1%)

Les caractéristiques démographiques et cliniques des deux groupes de patients sont rapportées dans le tableau XVII. Ces deux populations sont rigoureusement comparables et ne présentent pas de différence significative sur le plan de l'âge et du rang de tentative de la FIV.

	<b>Groupe 1</b> (n=411)	<b>Groupe 2</b> (n=597)	<b>P-value</b>
Age moyen femmes (années)	32,9 ± 4,6	32,9 ± 4,7	0,8
Age moyen hommes (années)	35,8 ± 5,3	35,7 ± 5,7	0,9
Rang moyen tentative	2,0 ± 1,1	1,9 ± 1,0	0,5

**Tableau XVII : Comparaison de l'âge des patients et du rang de la tentative**

Les caractéristiques des tentatives de FIV des couples sont rapportées dans le tableau XVIII. Nous n'avons pas observé de différence significative dans la répartition FIV conventionnelle / ICSI, dans le nombre moyen d'ovocytes recueillis et inséminés et dans le nombre moyen d'embryons obtenus et transférés. Ainsi, on considère que les deux populations étudiées sont comparables.

En revanche, nous observons une différence significative dans le nombre moyen d'embryons surnuméraires congelés.

	<b>Groupe 1</b>	<b>Groupe 2</b>	<b>P-value</b>
% FIV conventionnelle	38,7	39,9	0,8
Nombre moyen d'ovocytes recueillis	11,9 ± 5,9	11,2 ± 5,7	0,8
Nombre moyen d'ovocytes inséminés	10,7 ± 5,2	10,2 ± 5,2	0,1
Nombre moyen d'embryons à J2-J3	8,0 ± 4,0	7,5 ± 4,0	0,06
Nombre moyen d'embryons transférés	1,6 ± 0,6	1,6 ± 0,5	0,2
Nombre moyen d'embryons congelés	3,0 ± 2,2	1,1 ± 1,6	< 0,01

**Tableau XVIII : Comparaison des caractéristiques des tentatives de FIV**

Les résultats concernant l'ensemble des transferts d'embryons « frais » et congelés ainsi que les résultats cumulés pour chaque cohorte embryonnaire sont rapportés dans le tableau XIX.

	<b>Groupe 1 (n=411)</b>	<b>Groupe 2 (n=597)</b>	
Nombre de grossesses « en frais »	122 (28 annulations pour hyperstimulations)	193 (420 transferts stade clivé ; 161 transferts blastocyste ; 16 annulations pour hyperstimulations)	
Taux de grossesses « en frais » (%)	<b>31,8</b>	<b>33,2</b>	P = 0,7
Nombre moyen d'embryons congelés	3,0 ± 2,2	1,1 ± 1,6	
Nombre de TEC	450	271	
Nombre de grossesses en TEC	32	42	
Taux de grossesses en TEC (%)	7,1	15,5	
Nombre total de grossesses	154	235	
Taux cumulé de grossesses (%)	<b>37,5</b>	<b>39,4</b>	P = 0,6

**Tableau XIX : Résultats cumulés des transferts « frais » + TEC**

Les taux de grossesses après transfert d'embryons « frais » ne sont pas différents dans les 2 groupes (31,8% *versus* 33,2%). Les taux cumulés de grossesses par ponction dans les 2 groupes ne présentent pas non plus de différence significative (37,5% *versus* 39,4%).



## DISCUSSION

Dans un premier temps, le travail a consisté à analyser de façon exhaustive les transferts d'embryons congelés réalisés au CHU de Grenoble de début 2005 à fin 2009 au sein d'une population non-sélectionnée. Mille vingt-deux décongélations embryonnaires ont été programmées correspondant à 900 transferts effectivement réalisés, dont 621 au stade clivé et 279 au stade de blastocyste.

Le succès d'un TEC relève du taux de survie après décongélation puis des capacités de développement de l'embryon. Dans notre étude le taux de survie le plus élevé est constaté pour les blastocystes (89,6%), significativement supérieur à celui d'un embryon décongelé à J2-J3 (80,9%). Ces taux sont plutôt élevés par rapport aux données de la littérature qui varient de 65% à 95% pour un blastocyste [20]. Il faut noter néanmoins que le taux de survie du blastocyste est peut être surévalué par le fait que très souvent le transfert est réalisé avant la ré-expansion complète du blastocœle. Pour Veeck, le stade de blastocyste semble le moment le plus approprié pour cryoconserver les embryons. Les cellules composant le blastocyste, quantitativement plus importantes et de plus petite taille, résistent mieux à la congélation. Il résulte un taux de survie après décongélation meilleur par rapport à un embryon clivé [72].

Afin d'évaluer l'impact de notre politique de transfert, nos résultats ont été comparés aux données de l'ABM [1]. Les taux de grossesses cliniques et d'accouchements par TEC du centre d'AMP du CHU de Grenoble apparaissent en deçà des résultats nationaux (12,0% *versus* 17,8% et 8,8% *versus* 12,8%). Mais le taux de grossesses par transfert n'est pas un modèle d'expression objectif d'évaluation puisqu'il ne tient pas compte des protocoles et politiques de transfert inhérents à chaque centre d'AMP, notamment du nombre d'embryon(s) transféré(s). Exprimer les résultats des TEC en taux d'implantation par embryon transféré permet de standardiser les résultats. Ce modèle d'expression offre une meilleure évaluation de nos pratiques.

Ainsi, on remarque que le taux global d'implantation de 9,4% n'est pas différent du taux d'implantation après TEC publié annuellement par l'ABM, soit 10,3% pour l'année 2008. Si le taux de grossesses par TEC de notre centre est plus faible, c'est simplement parce que nous transférons moins d'embryons (1,4 *versus* 1,7). Dans le même ordre d'idée, la proportion des TEC avec transfert de  $\geq 2$  embryons est largement plus faible que la moyenne

nationale (36% *versus* 59,6%). De plus, les praticiens du centre ont décidé, depuis 2007, d'arrêter le transfert de plus de 2 embryons en même temps.

Ce constat reflète l'attitude prudente des praticiens du CHU de Grenoble qui veulent limiter le risque de grossesses multiples, ces grossesses étant associées à une incidence accrue de morbidité et mortalité maternelle, néonatale et périnatale [40]. Effectivement, nous constatons que, sur la période étudiée, le taux de grossesses gémellaires de notre centre est faible (6,5%) et que le taux d'accouchements multiples est inférieur à celui issu des données de l'ABM (4,7% *versus* 10,1%).

Concernant la comparaison des résultats des « TEC J2-J3 » et des « TEC blastocyste », nous observons que le taux de grossesse par TEC est significativement supérieur après transfert de blastocyste, et ce pour un nombre moyen d'embryon transféré tendant vers 1,3 embryon par transfert au stade clivé et au stade de blastocyste. Ceci se traduit donc par un taux d'implantation des blastocystes décongelés de 15,1%, significativement supérieur (plus de 2 fois) au taux d'implantation des embryons décongelés au stade précoce (7%).

Peu d'études comparent les taux d'implantation après TEC de blastocystes par rapport aux embryons clivés. Aussi, l'analyse de la littérature s'est avérée fastidieuse, notamment par l'absence d'harmonisation des techniques entre les laboratoires d'AMP induisant des résultats différents selon les centres et par l'absence d'exhaustivité des données (causes d'infertilité, conditions de culture des embryons, protocoles de congélation, description incomplète de la population...) entraînant ainsi des biais d'interprétation. En effet, les résultats des études sont à interpréter en fonction des populations étudiées : des facteurs comme l'âge, la durée et le type d'infertilité influencent les taux d'implantation des embryons. Rappelons que notre population d'étude n'était soumise à aucun critère de sélection hormis le fait d'avoir congelé des embryons. La transparence des résultats en AMP nécessite donc la prise en compte des performances techniques de chaque centre, mais également la connaissance de ses critères de recrutement de population, d'annulation de cycles, de transfert et de congélation d'embryons.

Toutefois, deux études ont retenu notre attention [72-73]. Aucun de ces essais n'était randomisé et réalisé de façon prospective. Veeck trouve un potentiel implantatoire des blastocystes décongelés également supérieur à celui des embryons clivés (38,6% *versus* 15,9%). Ces résultats ne sont pas superposables aux nôtres car ils sont issus d'une population

de meilleur pronostic. L'étude de Moragianni compare les résultats des TEC d'embryons à J1, J3 et des blastocystes. Là encore, les taux de grossesse et d'implantation sont supérieurs pour le blastocyste (31,7% et 19%) comparés à l'embryon précoce (25,8% et 14%). Néanmoins, dans cette publication, les indications des différents stades de congélation ne sont pas explicitées, il est difficile de savoir si ces populations étaient comparables.

Le nombre d'embryons transférés joue un rôle important dans les chances de grossesse. Une différence significative est retrouvée entre les taux de grossesse après transfert d'un ou de deux blastocyste (14,4% et 25,6% respectivement). Afin de limiter les grossesses gémellaires (taux de 25% après TEC de 2 blastocystes), il pourrait être recommandé de ne transférer qu'un seul blastocyste à la fois. Actuellement, l'évolution des pratiques s'oriente vers le transfert mono-embryonnaire pour limiter le risque de grossesse multiple. La culture jusqu'au stade de blastocyste, à fort potentiel implantatoire, paraît une alternative tout à fait séduisante et bien acceptée par les couples. Il faut probablement s'attendre au cours des prochaines années, comme c'est déjà le cas en Australie ou en Nouvelle-Zélande, à une augmentation des transferts au stade blastocyste parallèlement à la progression des transferts embryonnaires uniques [74].

Par ailleurs, les blastocystes sont transférés/congelés à J5 ou J6 en fonction de leur évolutivité. Aucune différence significative dans les taux d'implantation et de grossesse n'est retrouvée après TEC à J5 ou J6. Dans une étude rétrospective sur une durée de 5 ans, Levens a évalué le facteur pronostic d'une congélation à J5 ou J6 en comparant 100 TEC dans le groupe J5 et 72 dans le groupe J6. Les caractéristiques des couples (âge, cause d'infertilité, proportion de FIV/ICSI) et de la FIV (transferts « frais », nombre d'embryons congelés) étaient comparables dans les 2 groupes. Les taux de grossesse après TEC ne montraient pas de différence significative [75]. D'autres études mettent en évidence des résultats similaires [72, 76-77]. Le jour de congélation ne semble donc pas être un critère pronostique d'implantation du blastocyste contrairement à ce qui serait logiquement attendu. En effet, le stade blastocyste est normalement obtenu dès J5. Les embryons qui atteignent ce stade à J6 montrent un retard modéré de développement qui aurait pu avoir comme conséquence un taux d'implantation moindre. Notons qu'en frais, il existe une diminution des taux de grossesse après transfert à J6 par rapport à J5, ceci pouvant alors être expliqué par un asynchronisme de maturation de l'endomètre avec l'embryon [77].

Nous avons vu que la mise en culture prolongée des embryons permettait la sélection de blastocyste à haut potentiel implantatoire. Mais, en prolongeant la culture de quelques jours, un certain nombre d'embryons vont naturellement arrêter leur évolution et le risque de n'avoir pas d'embryons à congeler augmente alors considérablement [43]. Dans la deuxième partie de l'étude, nous avons voulu évaluer si cette perte de chance de congélation avait des conséquences en termes de perte de chance de grossesses pour les couples. Les taux cumulés de grossesses (nombre total de grossesses obtenues après transferts des embryons « frais » et des embryons congelés issus d'une même cohorte) nous a semblé un critère d'évaluation pertinent. En réalité, le chiffre exact du taux cumulé de grossesses ne pourrait être obtenu qu'avec un recul de quelques années après la dernière ponction ovocytaire (quand tous les embryons de la cohorte auront été utilisés). Dans une situation stable, nous considérerons le calcul réalisé comme une estimation raisonnable des taux cumulés de grossesses.

Le groupe 1 comprenait les ponctions pour lesquelles les embryons ont été congelés à un stade précoce (J2 ou J3). Le groupe 2 comprenait les ponctions pour lesquelles la congélation a eu lieu au stade de blastocyste (J5 ou J6) mais aussi les annulations de congélations après mise en culture prolongée (afin de ne pas surestimer les résultats de ce groupe). En effet, dans 53% des cas où les embryons surnuméraires ont été mis en culture prolongée, ces embryons ne présentaient pas des critères satisfaisants d'évolutivité et n'ont donc pas été congelés.

Les populations des 2 groupes décrits s'avéraient comparables sur le plan de l'âge des patients, du rang de tentative et des caractéristiques de la FIV (répartition FIV/ICSI, nombre moyen d'ovocytes recueillis et inséminés, nombre d'embryons obtenus et transférés). Les critères de comparaison des populations disponibles et exploitables à partir des données recueillies que nous avons utilisés pour l'analyse statistique sont limités. Les traitements de stimulations précédent le TEC, les indications de la FIV ou la morphologie des embryons obtenus, paramètres variables et susceptibles d'influencer les résultats, n'ont pas pu être pris en compte.

Comme attendu, le nombre moyen d'embryons congelés était significativement inférieur dans le groupe 2 par rapport au groupe 1 (1,1 blastocyste *versus* 3 embryons clivés). Les deux populations présentaient des taux de grossesses après transfert « frais » et des taux cumulés de grossesses par ponction non significativement différents. Rappelons que les taux

cumulés de grossesses (37,5% et 39,4%) ne sont que des sous-estimations du taux réel car tous les embryons congelés n'ont pas été utilisés : la proportion d'embryons congelés ayant été utilisés est de 36% pour le groupe 1 et de 40% pour le groupe 2. Si on extrapole artificiellement les résultats après utilisation de tous les embryons encore en banque, les taux cumulés de grossesses calculés sont toujours non significativement différents. Ces résultats sont rassurants pour la pratique de la culture prolongée : il n'y a donc pas de perte de chance de grossesse.

Trois études prospectives font état d'une méthodologie similaire basée sur un calcul de taux cumulé de grossesses. Ces études n'étaient pas réalisées dans l'optique de comparer uniquement la congélation au stade de blastocyste, mais prenaient aussi en compte les transferts « frais » à ce stade. Ainsi les cohortes embryonnaires des couples randomisés étaient transférées et congelées soit totalement au stade clivé soit totalement au stade de blastocyste [63, 66-67]. A partir d'une population non sélectionnée, Van der Auwera a mis en évidence des taux cumulés de naissances vivantes légèrement supérieurs à J5 (44% *versus* 32%) mais de façon non significative. Par contre Rienzi et Emiliani rapportent des taux cumulés de grossesses significativement plus élevés à J2-J3. Pour Emiliani, ceci peut être expliqué par un taux de survie étonnamment faible signalé dans leur groupe blastocyste (46% stade clivé *versus* 27% stade blastocyste). La politique dans le choix des embryons potentiellement congelables, ainsi que les protocoles de culture et de congélation semblent différents de notre centre, malheureusement ces renseignements ne sont pas précisés dans cette publication.

Les taux de survie d'un blastocyste après décongélation et d'implantation nettement supérieurs à un embryon clivé permettent de compenser la diminution du nombre d'embryons congelés à ce stade. En effet notre équipe a montré un taux cumulé de grossesses équivalent pour les deux stratégies de congélation. L'avantage de la congélation des embryons au stade de blastocyste pourrait s'exprimer d'abord en termes techniques et pratiques : elle permet une économie de coût et de temps technique (diminution des actes de congélation et de conservation dans les cuves). Mais les avantages essentiels concernent les patientes qui, à chance de grossesse égale, obtiendront une grossesse plus rapidement par la diminution du nombre de TEC nécessaires à l'utilisation de ses embryons surnuméraires congelés. Ceci représente pour les couples moins de contraintes de déplacements, de traitements

supplémentaires et d'échec à répétition. Psychologiquement, cette stratégie de congélation au stade de blastocyste est ainsi mieux acceptée.

Nos résultats nous encouragent à continuer la congélation après culture prolongée en privilégiant le transfert mono-embryonnaire d'un blastocyste. Toutefois, la nature rétrospective de notre travail et ses nombreux biais interprétatifs limitent la validité de l'étude. Une analyse prospective randomisée s'avérerait intéressante dans les années à venir afin de confirmer ces résultats.

TITRE :

Intérêt de la congélation au stade de blastocyste  
Évaluation rétrospective de la pratique de congélation au CHU de Grenoble

## CONCLUSION

La culture prolongée des embryons jusqu'au stade de blastocyste fait l'objet de nombreuses controverses aussi bien pour le transfert frais que pour la congélation embryonnaire. Le transfert frais au stade de blastocyste est largement décrit dans la littérature et semblerait présenter un avantage pour une population de couples dite de bon pronostic. La congélation au stade de blastocyste et les résultats en termes de grossesse après décongélation sont moins documentés.

Au CHU de Grenoble, les transferts frais après culture prolongée ne représentent que 10% des transferts et ses indications ne sont pas clairement définies, ils feront l'objet d'une évaluation ultérieure. Par contre, la congélation des embryons surnuméraires au stade de blastocyste est nettement privilégiée depuis 2007 et représente environ 65% des transferts d'embryons congelés (TEC).

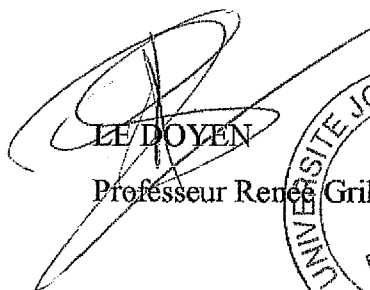
L'évaluation de cette pratique nous a permis de mettre en évidence un taux d'implantation après TEC au stade de blastocyste deux fois supérieur à celui obtenu après TEC d'embryons congelés au stade précoce. Cependant, la mise en culture prolongée des embryons diminue la probabilité de congélation par couple ainsi que le nombre moyen d'embryons congelés, ce qui pourrait représenter un inconvénient en termes de perte de chance de grossesse. La répercussion de cette pratique sur le taux cumulé de grossesses devait être évaluée. Ce taux prend en compte le nombre total de grossesses obtenues après transferts des embryons frais et des embryons congelés issus d'une même cohorte. Nous avons observé que le taux cumulé de grossesse avec congélation au stade de blastocyste n'est pas différent de celui avec congélation au stade précoce. Si le fait de moins congeler est un avantage technique et pratique, il représente surtout un confort pour les patientes avec des grossesses obtenues plus rapidement sans perte de chance (diminution du nombre de TEC nécessaires).


Enfin, le plus haut potentiel implantatoire rend le transfert mono-embryonnaire mieux accepté par les couples, ce qui permet de diminuer le taux de grossesses gémellaires.

Ces résultats nous encouragent à continuer à privilégier la pratique de la congélation embryonnaire après culture prolongée. Dans l'avenir, de nouvelles techniques prometteuses telles que la vitrification permettront peut-être d'améliorer encore ces résultats.

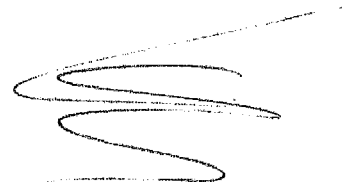
VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 25 novembre 2010

  
LE DOYEN  
Professeur René Grillet

  
UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE  
DE  
PHARMACIE  
\* GRENOBLE I \*

LE PRÉSIDENT DE THÈSE  
Professeur Patrice Faure





## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Site de l'agence de la biomédecine : [www.agence-biomedecine.fr](http://www.agence-biomedecine.fr)  
*Rapport annuel de l'agence de biomédecine 2009*  
(Bilan des activités de procréation et génétique humaine en France en 2008)
2. Ziebe, S., K. Petersen, S. Lindenberg, A.G. Andersen, A. Gabrielsen and A.N. Andersen, *Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization*. Hum Reprod, 1997. **12**(7): p. 1545-9.
3. Gardner, D.K., M. Lane, J. Stevens, T. Schlenker and W.B. Schoolcraft, *Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer*. Fertil Steril, 2000. **73**(6): p. 1155-8.
4. Braude, P., V. Bolton and S. Moore, *Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 459-61.
5. Hamatani, T., M. Ko, M. Yamada, N. Kuji, Y. Mizusawa, M. Shoji, T. Hada, H. Asada, T. Maruyama, and Y. Yoshimura, *Global gene expression profiling of preimplantation embryos*. Hum Cell, 2006. **19**(3): p. 98-117.
6. Rinaudo, P. and R.M. Schultz, *Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos*. Reproduction, 2004. **128**(3): p. 301-11.
7. Menezo, Y., A. Hazout, M. Dumont, N. Herbaut and B. Nicollet, *Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans*. Hum Reprod, 1992. **7 Suppl 1**: p. 101-6.
8. Gardner, D.K., M. Lane, I. Calderon and J. Leeton, *Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells*. Fertil Steril, 1996. **65**(2): p. 349-53.
9. Gardner, D.K., P. Vella, M. Lane, L. Wagley, T. Schlenker and W.B. Schoolcraft, *Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers*. Fertil Steril, 1998. **69**(1): p. 84-8.
10. Utsunomiya, T., T. Naitou and M. Nagaki, *A prospective trial of blastocyst culture and transfer*. Hum Reprod, 2002. **17**(7): p. 1846-51.
11. Biggers, J.D. and M.C. Summers, *Choosing a culture medium: making informed choices*. Fertil Steril, 2008. **90**(3): p. 473-83.
12. Dominguez, F., B. Gadea, A. Mercader, F.J. Esteban, A. Pellicer and C. Simon, *Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system*. Fertil Steril, 2010. **93**(3): p. 774-782 e1.
13. Bergh, C., C. Werner, L. Nilsson and L. Hamberger, *Cumulative birth rates following cryopreservation of all embryos in stimulated in vitro fertilization (IVF) cycles*. J Assist Reprod Genet, 1995. **12**(3): p. 191-4.
14. Queenan, J.T., Jr., L.L. Veeck, J.P. Toner, S. Oehninger and S.J. Muasher, *Cryopreservation of all prezygotes in patients at risk of severe hyperstimulation does not eliminate the syndrome, but the chances of pregnancy are excellent with subsequent frozen-thaw transfers*. Hum Reprod, 1997. **12**(7): p. 1573-6.

15. Trounson, A., *Preservation of human eggs and embryos*. Fertil Steril, 1986. **46**(1): p. 1-12.
16. Trounson, A. and L. Mohr, *Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo*. Nature, 1983. **305**(5936): p. 707-9.
17. Cohen, J., R.F. Simons, R.G. Edwards, C.B. Fehilly and S.B. Fishel, *Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts*. J In Vitro Fert Embryo Transf, 1985. **2**(2): p. 59-64.
18. Menezo, Y., B. Nicollet, N. Herbaut and D. Andre, *Freezing cocultured human blastocysts*. Fertil Steril, 1992. **58**(5): p. 977-80.
19. Van den Abbeel, E., M. Camus, G. Verheyen, L. Van Waesberghe, P. Devroey and A. Van Steirteghem, *Slow controlled-rate freezing of sequentially cultured human blastocysts: an evaluation of two freezing strategies*. Hum Reprod, 2005. **20**(10): p. 2939-45.
20. Youssry, M., B. Ozmen, K. Zohni, K. Diedrich and S. Al-Hasani, *Current aspects of blastocyst cryopreservation*. Reprod Biomed Online, 2008. **16**(2): p. 311-20.
21. Pantos, K., E. Makrakis, D. Stavrou, P. Karantzis, T. Vaxevanoglou and V. Tzigounis, *Comparison of embryo transfer on day 2, day 3, and day 6: a prospective randomized study*. Fertil Steril, 2004. **81**(2): p. 454-5.
22. Wang, Y.A., M. Chapman, M. Costello and E.A. Sullivan, *Better perinatal outcomes following transfer of fresh blastocysts and blastocysts cultured from thawed cleavage embryos: a population-based study*. Hum Reprod, 2010. **25**(6): p. 1536-42.
23. Guerif, F., M. Lemseffer, R. Bidault, O. Gasnier, M.H. Saussereau, V. Cadoret, C. Jamet, and D. Royere, *Single Day 2 embryo versus blastocyst-stage transfer: a prospective study integrating fresh and frozen embryo transfers*. Hum Reprod, 2009. **24**(5): p. 1051-8.
24. Papanikolaou, E.G., M. Camus, E.M. Kolibianakis, L. Van Landuyt, A. Van Steirteghem and P. Devroey, *In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos*. N Engl J Med, 2006. **354**(11): p. 1139-46.
25. Zech, N.H., B. Lejeune, F. Puissant, S. Vanderzwalmen, H. Zech and P. Vanderzwalmen, *Prospective evaluation of the optimal time for selecting a single embryo for transfer: day 3 versus day 5*. Fertil Steril, 2007. **88**(1): p. 244-6.
26. Stehlik, E., J. Stehlik, K.P. Katayama, M. Kuwayama, V. Jambor, R. Brohammer, and O. Kato, *Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts*. Reprod Biomed Online, 2005. **11**(1): p. 53-7.
27. Takahashi, K., T. Mukaida, T. Goto and C. Oka, *Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study*. Fertil Steril, 2005. **84**(1): p. 88-92.
28. Menezo, Y., J. Chouteau and A. Veiga, *In vitro fertilization and blastocyst transfer for carriers of chromosomal translocation*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2001. **96**(2): p. 193-5.
29. Magli, M.C., L. Gianaroli, A.P. Ferraretti, M. Lappi, A. Ruberti and V. Farfalli, *Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement*. Fertil Steril, 2007. **87**(3): p. 534-41.
30. Guerif, F., A. Le Gouge, B. Giraudeau, J. Poindron, R. Bidault, O. Gasnier, and D. Royere, *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**(7): p. 1973-81.

31. Magli, M.C., L. Gianaroli, S. Munne and A.P. Ferraretti, *Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor-prognosis patients*. J Assist Reprod Genet, 1998. **15**(5): p. 297-301.
32. Magli, M.C., G.M. Jones, L. Gras, L. Gianaroli, I. Korman and A.O. Trounson, *Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro*. Hum Reprod, 2000. **15**(8): p. 1781-6.
33. Graham, J., T. Han, R. Porter, M. Levy, R. Stillman and M.J. Tucker, *Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture*. Fertil Steril, 2000. **74**(3): p. 495-7.
34. Rijnders, P.M. and C.A. Jansen, *The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1998. **13**(10): p. 2869-73.
35. Norwitz, E.R., D.J. Schust and S.J. Fisher, *Implantation and the survival of early pregnancy*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1400-8.
36. Pereda, J. and H.B. Croxatto, *Human preimplantation development in vivo: ultrastructural observations*. Ann Acad Med Singapore, 1992. **21**(4): p. 480-8.
37. Valbuena, D., J. Martin, J.L. de Pablo, J. Remohi, A. Pellicer and C. Simon, *Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo*. Fertil Steril, 2001. **76**(5): p. 962-8.
38. de Ziegler, D., C. Bulletti, R. Fanchin, M. Epiney and P.A. Brioschi, *Contractility of the nonpregnant uterus: the follicular phase*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **943**: p. 172-84.
39. Fanchin, R., J.M. Ayoubi, C. Righini, F. Olivennes, L.M. Schonauer and R. Frydman, *Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers*. Hum Reprod, 2001. **16**(6): p. 1115-9.
40. Land, J.A. and J.L. Evers, *Risks and complications in assisted reproduction techniques: Report of an ESHRE consensus meeting*. Hum Reprod, 2003. **18**(2): p. 455-7.
41. Marek, D., M. Langley, D.K. Gardner, N. Confer, K.M. Doody and K.J. Doody, *Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program*. Fertil Steril, 1999. **72**(6): p. 1035-40.
42. Tsirigotis, M., *Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. Too soon to abandon current practice?* Hum Reprod, 1998. **13**(12): p. 3285-9.
43. Kolibianakis, E.M., K. Zikopoulos, W. Verpoest, M. Camus, H. Joris, A.C. Van Steirteghem, and P. Devroey, *Should we advise patients undergoing IVF to start a cycle leading to a day 3 or a day 5 transfer?* Hum Reprod, 2004. **19**(11): p. 2550-4.
44. Alikani, M., G. Calderon, G. Tomkin, J. Garrisi, M. Kokot and J. Cohen, *Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro*. Hum Reprod, 2000. **15**(12): p. 2634-43.
45. Racowsky, C., K.V. Jackson, N.A. Cekleniak, J.H. Fox, M.D. Hornstein and E.S. Ginsburg, *The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer*. Fertil Steril, 2000. **73**(3): p. 558-64.
46. Vitthala, S., T.A. Gelbaya, D.R. Brison, C.T. Fitzgerald and L.G. Nardo, *The risk of monozygotic twins after assisted reproductive technology: a systematic review and meta-analysis*. Hum Reprod Update, 2009. **15**(1): p. 45-55.

47. Menezes, Y.J., J. Chouteau, J. Torello, A. Girard and A. Veiga, *Birth weight and sex ratio after transfer at the blastocyst stage in humans*. Fertil Steril, 1999. **72**(2): p. 221-4.
48. Sills, E.S., M.J. Tucker and G.D. Palermo, *Assisted reproductive technologies and monozygous twins: implications for future study and clinical practice*. Twin Res, 2000. **3**(4): p. 217-23.
49. Meintjes, M., S.S. Crider-Pirkle, D.C. Ward, J.A. Rodriguez, S.J. Chantilis and J.D. Madden, *Sex ratio and birthweight outcome when considering blastocyst expansion, multiple gestation, and facility*. Fertility and sterility, 2001. **76**(3): p. S147.
50. Rodriguez, H.F., M. Bustillo, J. LaPalme, E. Riley, J. Eisermann and K. Thompson, *Clinical outcomes with transfer of blastocyst or cleavage stage embryos: high order pregnancies, newborn weights and sex ratios*. Fertility and sterility, 2001. **76**(3): p. S170.
51. Anderson, M., J. Graham, M. Tucker, T. Krecko, M.J. Levy and E. Widra, *Comparison of gender and birth weight following day-three and blastocyst transfers*. Fertility and sterility, 2001. **76**(3): p. S179.
52. Mercader, A., P. Gamiz, M.d.l. Santos, J. Remohí, A. Pellicer and C. Simón, *Sex ratio after day 2, day 3 or blastocyst transfer*. Fertility and sterility, 2001. **76**(3): p. S261-S262.
53. Wilson, M., K. Hartke, M. Kiehl, J. Rodgers, C. Brabec and R. Lyles, *Integration of blastocyst transfer for all patients*. Fertil Steril, 2002. **77**(4): p. 693-6.
54. Kausche, A., G.M. Jones, A.O. Trounson, F. Figueiredo, V. MacLachlan and N. Lolatgis, *Sex ratio and birth weights of infants born as a result of blastocyst transfers compared with early cleavage stage embryo transfers*. Fertil Steril, 2001. **76**(4): p. 688-93.
55. Milki, A.A., S.H. Jun, M.D. Hinckley, L.W. Westphal, L.C. Giudice and B. Behr, *Comparison of the sex ratio with blastocyst transfer and cleavage stage transfer*. J Assist Reprod Genet, 2003. **20**(8): p. 323-6.
56. Lin, P.Y., F.J. Huang, F.T. Kung, L.J. Wang, S.Y. Chang and K.C. Lan, *Comparison of the offspring sex ratio between cleavage stage embryo transfer and blastocyst transfer*. Taiwan J Obstet Gynecol, 2010. **49**(1): p. 35-9.
57. Blake, D.A., C.M. Farquhar, N. Johnson and M. Proctor, *Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(4): p. CD002118.
58. Papanikolaou, E.G., E. D'Haeseleer, G. Verheyen, H. Van de Velde, M. Camus, A. Van Steirteghem, P. Devroey, and H. Tournaye, *Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study*. Hum Reprod, 2005. **20**(11): p. 3198-203.
59. Frattarelli, J.L., M.P. Leondires, J.L. McKeeby, B.T. Miller and J.H. Segars, *Blastocyst transfer decreases multiple pregnancy rates in in vitro fertilization cycles: a randomized controlled trial*. Fertil Steril, 2003. **79**(1): p. 228-30.
60. Levron, J., A. Shulman, D. Bider, D. Seidman, T. Levin and J. Dor, *A prospective randomized study comparing day 3 with blastocyst-stage embryo transfer*. Fertil Steril, 2002. **77**(6): p. 1300-1.
61. Karaki, R.Z., S.S. Samarraie, N.A. Younis, T.M. Lahloub and M.H. Ibrahim, *Blastocyst culture and transfer: a step toward improved in vitro fertilization outcome*. Fertil Steril, 2002. **77**(1): p. 114-8.

62. Gardner, D.K., W.B. Schoolcraft, L. Wagley, T. Schlenker, J. Stevens and J. Hesla, *A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization*. Hum Reprod, 1998. **13**(12): p. 3434-40.
63. Rienzi, L., F. Ubaldi, M. Iacobelli, S. Ferrero, M.G. Minasi, F. Martinez, J. Tesarik, and E. Greco, *Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer*. Hum Reprod, 2002. **17**(7): p. 1852-5.
64. Hreinsson, J., B. Rosenlund, M. Fridstrom, I. Ek, L. Levkov, P. Sjoblom, and O. Hovatta, *Embryo transfer is equally effective at cleavage stage and blastocyst stage: a randomized prospective study*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2004. **117**(2): p. 194-200.
65. Bungum, M., L. Bungum, P. Humaidan and C. Yding Andersen, *Day 3 versus day 5 embryo transfer: a prospective randomized study*. Reprod Biomed Online, 2003. **7**(1): p. 98-104.
66. Emiliani, S., A. Delbaere, A.S. Vannin, J. Biramane, M. Verdoodt, Y. Englert, and F. Devreker, *Similar delivery rates in a selected group of patients, for day 2 and day 5 embryos both cultured in sequential medium: a randomized study*. Hum Reprod, 2003. **18**(10): p. 2145-50.
67. Van der Auwera, I., S. Debrock, C. Spiessens, H. Afschrift, E. Bakelants, C. Meuleman, L. Meeuwis, and T.M. D'Hooghe, *A prospective randomized study: day 2 versus day 5 embryo transfer*. Hum Reprod, 2002. **17**(6): p. 1507-12.
68. Coskun, S., J. Hollanders, S. Al-Hassan, H. Al-Sufyan, H. Al-Mayman and K. Jaroudi, *Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial*. Hum Reprod, 2000. **15**(9): p. 1947-52.
69. Levitas, E., E. Lunenfeld, I. Har-Vardi, S. Albotiano, Y. Sonin, R. Hackmon-Ram, and G. Potashnik, *Blastocyst-stage embryo transfer in patients who failed to conceive in three or more day 2-3 embryo transfer cycles: a prospective, randomized study*. Fertil Steril, 2004. **81**(3): p. 567-71.
70. Guerif, F., R. Bidault, O. Gasnier, M.L. Couet, O. Gervereau, J. Lansac, and D. Royere, *Efficacy of blastocyst transfer after implantation failure*. Reprod Biomed Online, 2004. **9**(6): p. 630-6.
71. Jones, G.M., A.O. Trounson, N. Lolatgis and C. Wood, *Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer*. Fertil Steril, 1998. **70**(6): p. 1022-9.
72. Veeck, L.L., R. Bodine, R.N. Clarke, R. Berrios, J. Libraro, R.M. Moschini, N. Zaninovic, and Z. Rosenwaks, *High pregnancy rates can be achieved after freezing and thawing human blastocysts*. Fertil Steril, 2004. **82**(5): p. 1418-27.
73. Moragianni, V.A., J.D. Cohen, S.E. Smith, J.S. Schinfeld, S.G. Somkuti, A. Lee, and L.I. Barmat, *Outcomes of day-1, day-3, and blastocyst cryopreserved embryo transfers*. Fertil Steril, 2010. **93**(4): p. 1353-5.
74. Wang, Y.A., G. Kovacs and E.A. Sullivan, *Transfer of a selected single blastocyst optimizes the chance of a healthy term baby: a retrospective population based study in Australia 2004-2007*. Hum Reprod, 2010. **25**(8): p. 1996-2005.
75. Levens, E.D., B.W. Whitcomb, S. Hennessy, A.N. James, B.J. Yauger and F.W. Larsen, *Blastocyst development rate impacts outcome in cryopreserved blastocyst transfer cycles*. Fertil Steril, 2008. **90**(6): p. 2138-43.

76. Behr, B., J. Gebhardt, J. Lyon and A.A. Milki, *Factors relating to a successful cryopreserved blastocyst transfer program*. Fertil Steril, 2002. **77**(4): p. 697-9.
77. Richter, K.S., S.K. Shipley, I. McVeary, M.J. Tucker and E.A. Widra, *Cryopreserved embryo transfers suggest that endometrial receptivity may contribute to reduced success rates of later developing embryos*. Fertil Steril, 2006. **86**(4): p. 862-6.





# Serment des Apothicaire



Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

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 l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

**LHEUREUX Hélène**

**Intérêt de la congélation au stade de blastocyste : Évaluation rétrospective  
de la pratique de congélation au CHU de Grenoble**

**RÉSUMÉ**

Un regain d'intérêt pour la culture prolongée des embryons obtenus après Fécondation *In Vitro* jusqu'au stade de blastocyste s'est développé vers la fin des années 1990 avec l'arrivée de nouveaux milieux de culture séquentiels. La culture prolongée permet le transfert de l'embryon dans l'utérus à un moment physiologiquement plus adapté et améliore la sélection des embryons à plus haut potentiel implantatoire. Le transfert frais au stade de blastocyste est largement décrit dans la littérature et semblerait présenter un avantage pour une population de couples dits de bon pronostic. La congélation au stade de blastocyste et les résultats en termes de grossesse après décongélation sont moins documentés et restent l'objet de controverses. L'objectif de cette étude était d'évaluer la pratique de congélation au CHU de Grenoble où la congélation des embryons surnuméraires au stade de blastocyste est pratiquée depuis 2005 et est nettement privilégiée depuis 2007. Nous avons analysé les données des 1022 cycles de Transfert d'Embryon Congelés (TEC) faits depuis 2006 (279 au stade de blastocyste et 621 au stade clivé précoce). Le taux d'implantation après TEC au stade de blastocyste est deux fois supérieur à celui obtenu après TEC d'embryons congelés au stade précoce (15% versus 7%). Comme le nombre d'embryons congelés au stade de blastocyste par tentative est plus faible qu'au stade clivé (1,1 versus 3), nous avons complété l'étude par l'évaluation du taux cumulé de grossesses qui intègre les grossesses obtenues après transferts d'embryons frais et congelés issus d'une même cohorte d'embryons. Ce taux est équivalent pour les deux stratégies (39,4% et 37,5%). Si le fait de moins congeler est un avantage technique et pratique, il représente surtout un confort pour les patientes avec des grossesses obtenues plus rapidement sans perte de chance. De plus, le haut potentiel implantatoire des blastocystes rend le transfert mono-embryonnaire mieux accepté par les couples, ce qui permet de diminuer le risque de grossesse gémellaire. Ainsi, ce bilan encourage notre centre d'Assistance Médicale à la Procréation à continuer à privilégier autant que possible, la congélation des embryons surnuméraires au stade de blastocyste suivie de TEC mono-embryonnaires.

**MOTS-CLÉS**

Blastocyste – Cryoconservation – Transfert embryonnaire – Taux cumulé de grossesse

**JURY**

Monsieur le Professeur Patrice FAURE  
Madame le Docteur Ulrike BERGUES  
Madame le Docteur Claire THOMAS CADI  
Monsieur le Docteur Charles COUTTON

**DATE DE SOUTENANCE**

16 décembre 2010

**ADRESSE**

14, rue des capucins - 59380 BERGUES  
HLheureux@voila.fr