



**HAL**  
open science

# Le devenir des embryons surnuméraires après transfert frais

Lorraine Guinand

► **To cite this version:**

Lorraine Guinand. Le devenir des embryons surnuméraires après transfert frais. Gynécologie et obstétrique. 2015. dumas-01220580

**HAL Id: dumas-01220580**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01220580>**

Submitted on 26 Oct 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE VERSAILLES SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES

UFR DES SCIENCES DE LA SANTE SIMONE VEIL

## **Département de maïeutique**

DE L'UNIVERSITE DE VERSAILLES SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES

DISCIPLINE / SPECIALITE : Maïeutique

Présenté par :

**LORAINE GUINAND**

En vue de l'obtention du **Diplôme d'Etat de sage-femme**

# **Le devenir des embryons surnuméraires après transfert frais**

Soutenu publiquement le 01/07/2015

## **JURY**

Directeur de mémoire: Dr Khaled Pocate Cheriet, Praticien hospitalier en biologie de la reproduction à l'hôpital Cochin/Port-Royal.

Expert de mémoire: Dr Nathalie Le foll, Assistante hospitalo-universitaire en biologie de la reproduction à l'hôpital Cochin/Port-Royal.

Numéro national d'étudiant : 21108477

## **Avertissement**

Ce mémoire est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de sage-femme. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

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 toute poursuite pénale.

## Remerciements

Je remercie toutes les personnes m'ayant accompagnée et aidée lors de la réalisation de ce mémoire:

Mon directeur de mémoire, le Docteur Khaled Pocate Cheriet, pour sa disponibilité, son investissement, son soutien, ses conseils, sa pédagogie et sa contribution à la mise en place de l'étude.

Les Docteurs Daniel Vaiman et Pietro Santulli qui ont grandement participé à la réalisation statistique de l'étude.

Madame Etchemendigaray, directrice du département de maïeutique de l'UVSQ qui m'a guidée, et encouragée lors de mes études.

Et également l'ensemble de l'équipe pédagogique du département de maïeutique de l'UVSQ pour leur accompagnement tout au long de mes études de sage femme.

Ma famille

Mes amis

# Table des matières

<b>AVERTISSEMENT</b>	<b>II</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>IV</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES ANNEXES</b>	<b>IX</b>
<b>LEXIQUE</b>	<b>IX</b>
<b>RESUME</b>	<b>IXI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XII</b>
<b>1 PREMIERE PARTIE:INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1.1 La fécondation in vitro: aspects cliniques et techniques</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 Aspects cliniques</b>	<b>2</b>
1.1.1.1 Stimulation et ponction ovarienne	2
<b>1.1.2 Aspects techniques: déroulement d'une FIV au laboratoire</b>	<b>2</b>
1.1.2.1 Traitement des gamètes: ovocytes et spermatozoïdes	2
1.1.2.2 La mise en fécondation	3
1.1.2.2.1 La FIV classique	3
1.1.2.2.2 La micro-injection du spermatozoïde (ISCI)	3
1.1.2.3 À J0: observation des ovocytes fécondés	4
1.1.2.4 A J2 ou J3: observation et transfert embryonnaire	4
1.1.2.4.1 Observation et transfert embryonnaire	4
	<b>IV</b>



1.2.2.4.2	Devenir des embryons surnuméraires et la culture prolongée	5
<b>1.2</b>	<b>Première semaine de développement embryonnaire</b>	<b>6</b>
1.2.1	Fécondation, stade zygote et clivé J2-J3	6
1.2.2	Formation et compaction de la morula	7
1.2.3	Formation et éclosion du blastocyste	7
<b>1.3</b>	<b>Politique de transfert mono-embryonnaire</b>	<b>8</b>
1.3.1	Intérêts de la culture prolongée	8
1.3.2	Les limites de la culture prolongée	9
1.3.2	La congélation embryonnaire	10
<b>1.4</b>	<b>Evaluation de la qualité embryonnaire</b>	<b>11</b>
1.4.1	Cinétique du développement embryonnaire in vitro et qualité embryonnaire	11
4.1.1.1	Analyse des pronoyaux (J1)	11
4.1.1.2	Evaluation du clivage embryonnaire (J2/J3)	11
4.1.1.2.1	Cinétique de clivage	12
4.1.1.2.2	Taille des blastomères: typicité	12
4.1.1.2.3	L'existence d'une fragmentation	12
4.1.1.2.4	Statut nucléaire des blastomères	13
4.1.1.2.5	Scores embryonnaires	14
4.1.1.3	La qualité du blastocyste	14
1.4.2	Les limites de la morphologie embryonnaire	16
<b>2</b>	<b>SECONDE PARTIE: PRESENTATION DE L'ETUDE ET DES RESULTATS</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Matériel et méthode</b>	<b>18</b>
2.1.1	Type d'étude	18
2.1.2	Population d'étude	18
2.1.3	Présentation de l'outil	21
2.1.4	Critères d'inclusion et d'exclusion	21
2.1.4.1	Critères d'inclusion	21
2.1.4.2	Critères d'exclusion	21
2.1.5	Critère principal et secondaire d'évaluation	21
2.1.5.1	Critère principal de jugement	21
2.1.5.2	Critère secondaire de jugement	21

<b>2.1.5 Analyse Statistique</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Présentation des résultats</b>	<b>22</b>
<b>2.2.1 Description de la population générale et résultats obtenus</b>	<b>21</b>
<b>3 TROISIEME PARTIE: DISCUSSION</b>	<b>26</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>34</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>42</b>

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Classification du bouton embryonnaire et du trophoctoderme du blastocyste selon Gardner.....	15
<b>Tableau 1.1:</b> Ages des patientes, taux de blastoformation utile et totale en FIV et ICSI.....	23
<b>Tableau 1.2:</b> Blastoformation en fonction du nombre de cellules à J2.....	23
<b>Tableau 1.3:</b> Blastoformation en fonction du degré de fragmentation.....	24
<b>Tableau 1.4:</b> Blastoformation en fonction du caractère typique ou atypique des blastomères.....	24
<b>Tableau 1.5:</b> Blastoformation en fonction de la multinucléation à J2.....	24
<b>Tableau 1.6:</b> Issues des décongélations des blastocystes.....	25





## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Zygote au stade deux pronoyaux.....	4
<b>Figure 2:</b> Morphologie embryonnaire idéale à J2 (4 cellules), à J3 (8 cellules) et sans fragments.....	5
<b>Figure 3:</b> La segmentation.....	6
<b>Figure 4:</b> Stade J5-J6: formation du blastocyste.....	7
<b>Figure 5:</b> Eclosion du blastocyste.....	8
<b>Figure 6:</b> Cinétique de développement embryonnaire.....	12
<b>Figure 7:</b> Fragments cellulaires au sein d'un embryon de deux cellules.....	13
<b>Figure 8:</b> Blastomère multinuclée (3 noyaux) dans un embryon à 2 cellules.....	13
<b>Figure 9:</b> Evolution du blastocyste.....	14
<b>Figure 10:</b> Masse cellulaire interne et trophoctoderme du blasocyste.....	15
<b>Figure 11:</b> Illustrations des stades de développement embryonnaire de bonne et de mauvaise qualité.....	46



## Liste des annexes

<b>Annexe 1:</b> Illustrations des stades de développement embryonnaire de bonne et de mauvaise qualité.....	42
--	----



# Lexique

**AMH** : Hormone Anti-Mullérienne

**AMP**: Assistance Médicale à la Procréation

**CCO**: Complexes Cumulo-Ovocytaires

**CP**: Culture Prolongée

**EMQ**: Embryon de Mauvaise Qualité

**FIV**: Fécondation *in vitro*

**FSH**: Follicule Stimulating Hormone (hormone de stimulation folliculaire sécrétée par l'hypophyse)

**FCS**: Fausse Couche Spontanée

**GEU**: Grossesse Extra-Utérine

**GnRH**: Gonadotropin Releasing Hormone (hormone stimulant la sécrétion de la LH et de la FSH par l'hypophyse)

**hCG**: human Chorionic Gonadotropin

**ICM**: Masse Cellulaire Interne

**ICSI**: Intracytoplasmic Sperm Injection (injection intra-cytoplasmic de sperme)

**IMG**: Interruption médicale de grossesse

**J2-J3-J5-J6**: deuxième, troisième, cinquième jour et sixième jour post-fécondation

**LH**: Luteinizing Hormone (hormone de lutéanisation sécrétée par l'hypophyse)

**MFIU**: Mort Fœtale In Utéro

**OAT**: Oligo-Asthéno-Tératospermie (oligospermie: faible quantité de spermatozoïdes dans le sperme, inférieure à 20 millions de spermatozoïdes par ml, asthénozoospermie: moins de 50% de spermatozoïdes mobiles une heure après l'éjaculation, tératozoospermie: moins de 30% de spermatozoïdes normaux)

**ON**: Organismes nucléolaires

**TE**: Trophectoderme

**TME**: Transfert Mono-Embryonnaire

## Résumé

**Objectifs:** Généralement, les embryons de bonne qualité sont choisis pour être transférés et cryoconservés au stade clivé à J2-J3, les embryons de mauvaise qualité (EMQ) sont habituellement détruits. Notre objectif d'étude était de connaître le devenir des embryons surnuméraires en culture prolongée quelque soit leur qualité à J2, et de statuer sur le potentiel d'implantation et de grossesse évolutive des blastocystes obtenus à partir d'EMQ.

**Matériel et méthodes:** Etude rétrospective du 1er novembre 2012 au 1er juillet 2014. Le critère de jugement principal était le taux de blastoformation total (le nombre total de blastocystes obtenus à J5 et J6 quelque soit leur qualité) et utile (le nombre total de blastocystes de bonne qualité et congelés à J5 et J6). Les critères de jugement secondaires étaient le taux de grossesse clinique (sac gestationnel intra-utérin avec activité cardiaque), de naissance et de fausse couche.

**Résultats:** Au total, 3108 embryons ont été mis en culture prolongée dont 1319 issus de FIV et 1789 d'ICSI. Les taux de blastoformation totale (J5+J6) étaient équivalents en FIV en ICSI (56,6% vs 53,2%). A l'inverse, le taux de blastoformation utile (blastocystes congelés J5+J6) était significativement plus élevé en FIV (28.7% vs 25%). La majorité des blastocystes congelés provenaient d'embryons présentant une cinétique de clivage optimale pour le jour d'observation (J2) et de manière équivalente dans les deux groupes (73.6% vs 76.3%).

Les taux de grossesse clinique étaient de 39% en FIV vs 43.2% en ICSI. Le taux d'accouchement était significativement plus élevé en ICSI (20,5 % vs 50%) mais avec un nombre de grossesse évolutives en cours équivalent entre FIV et ICSI (14.4% vs 20.8%).

**Conclusion:** Notre étude confirme les données rapportées dans la littérature concernant l'évaluation morphologique de la qualité embryonnaire. Les blastocystes sont issus principalement d'embryons J2 de bonne qualité, toutefois des blastoformations et des naissances peuvent être obtenues à partir d'EMQ.

**Mots-clés :** fécondation in vitro, embryons surnuméraires, embryon au stade clivé, blastocyste, morphologie embryonnaire.

## Abstract

**Objectives:** In general, good quality embryos are chosen in order to be transferred and cryopreserved at the cleavage stage (day 2 / day 3), poor-quality embryos (PQE) are usually destroyed. The aim of our study was to evaluate the issue of prolonged culture of supernumerary embryos whatever their quality at day 2, and to determine the implantation and evolutive pregnancy potential of the blastocysts derived from PQE.

**Material and Methods:** Retrospective study conducted from November 1<sup>st</sup>, 2012 to July 1<sup>st</sup>, 2014. The primary endpoint was the total blastulation rate (total number of blastocysts obtained at Day 5 and Day 6 whatever their quality) and the useful (total number of good quality blastocysts frozen at Day 5 and Day 6). Secondary assessment criteria were the clinical pregnancy, birth and miscarriage rates.

**Results:** 3108 embryos were maintained in extended culture (1319 obtained from IVF, 1789 from ICSI). The total blastulation rate was equivalent in IVF and ICSI (56.6% vs 53.2%). In contrast, the rate of useful blastulation (blastocysts frozen at day 5 + day 6) was significantly higher in IVF (28.7% versus 25%). The majority of frozen blastocysts derived from embryos having an optimal kinetic at cleavage stage in the two groups (73.6% vs 76.3%).

The clinical pregnancy rate was 39% in IVF vs 43.2% in ICSI. The birth rate was significantly higher in ICSI (20.5% versus 50%) but with an equivalent number of ongoing pregnancies (14.4% vs 20.8%).

**Conclusion:** Our study confirms reported data in literature about the morphological evaluation of embryo quality. The blastocysts are mainly obtained from good quality embryos at day 2. Nevertheless, blastulations and births could be obtained from EMQ.

**Key words:** in vitro fertilization, supernumerary embryos, cleavage stage embryos, blastocysts, embryo morphology.



# 1 PREMIÈRE PARTIE: INTRODUCTION

En 1954, la première fécondation *in vitro* d'un ovocyte de mammifère chez la lapine a été réalisée à partir de spermatozoïdes capacités au sein de l'utérus et d'ovocytes dernièrement ovulés. Quelques années après, les lapereaux sont nés; confirmant ainsi la normalité biologique des embryons issus de la fécondation *in vitro* (FIV). Les premières FIV dans ces conditions ont été obtenues chez les rongeurs (1963-1968) puis chez l'homme en 1969. En 1978, naît en Angleterre Louise Brown, le premier enfant issu d'une fécondation *in vitro*. L'avènement de l'ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection) au début des années 1990 a permis une prise en charge plus efficace des infertilités d'origine masculine. Depuis, les progrès en assistance médicale à la reproduction (AMP) ne cessent d'être réalisés avec une amélioration constante de ses résultats. [1,2].

Néanmoins un certain nombre d'entre-eux restent à ce jour décevants. Selon le rapport de l'agence de la biomédecine publié en 2012, les taux de grossesses échographiques après transfert issues de FIV et ICSI intraconjugales sont respectivement de 29,3% et 23,6% et les taux d'accouchements après transfert respectifs de 23,7,6% et 29,1%. [3].

Ainsi, en France en 2012, on estime à 819 191 le nombre de naissances vivantes dont près de 2,9 % issues de l'AMP. [3].

## 1.1 La fécondation *in vitro*: aspects cliniques et techniques

La FIV consiste à recueillir les gamètes du couple pour réaliser une fécondation extracorporelle, puis à transférer les embryons ainsi obtenus dans l'utérus.

Contrairement à d'autres techniques d'AMP, la FIV nécessite la réalisation d'une série d'étapes optimales, pointilleuses et rigoureuses *in vitro* pour aboutir à l'obtention d'embryons et de grossesses par la suite.

La procédure de la FIV se déroule sur deux ou trois jours, voire cinq ou six jours si elle se poursuit en culture prolongée et comporte plusieurs étapes:

- A J0: recueil des ovocytes après stimulation ovarienne, recueil et préparation des spermatozoïdes, et mise en fécondation des gamètes par insémination ou injection.
- A J1: recherche des signes de fécondation après 18 à 22 heures d'incubation.

- A J2 (44 à 48 heures) ou J3 (72 heures): transfert in utero du ou des embryons sélectionnés. Les embryons surnuméraires sont congelés le jour même pour un transfert ultérieur ou maintenus en culture prolongée (CP) jusqu'au 5<sup>ème</sup> ou 6<sup>ème</sup> jour pour être congelés au stade blastocyste.

## **1.1.1 Aspects cliniques**

### **1.1.1.1 La stimulation et ponction ovarienne**

Le but de la stimulation ovarienne est de recueillir un nombre satisfaisant d'ovocytes matures pour augmenter les chances d'obtenir des embryons. Différents types de protocoles de stimulation existent : longs, courts ou en cycle naturel.

Quatre phases vont ainsi se succéder: la mise au repos des ovaires par agoniste GnRH (Gonodotrope Releasing Hormone) ou antagoniste GnRH, la stimulation de la croissance folliculaire fait par administration quotidienne de FSH (Follicle Stimulating Hormone), et surveillée par des échographies et des dosage hormonaux pour déterminer le meilleur moment pour déclencher l'ovulation et éviter l'hyperstimulation. Le déclenchement de l'ovulation par hCG (human Chorionic Gonadotrophin) ou par agoniste de la GnRH (Decapeptyl<sup>®</sup>) vient donc achever cette période de stimulation ovarienne, et est réalisé 34 à 36 heures avant la ponction folliculaire. En moyenne, une dizaine de follicules sont ponctionnés. [4].

La ponction ovarienne est réalisée au bloc opératoire, sous anesthésie locale ou générale et sous contrôle échographique. Une sonde endovaginale est munie d'un guide sur lequel est monté une aiguille qui permet de venir ponctionner, et aspirer un à un les follicules au travers de la paroi postérieure du vagin. Le liquide folliculaire est ensuite transmis au laboratoire qui recherche les complexes cumulo-ovocytaires (CCO).

## **1.1.2 Aspects techniques: déroulement d'une FIV au laboratoire**

### **1.1.2.1 A J0 : Traitement des gamètes: ovocytes et spermatozoïdes**



L'examen des liquides folliculaires, à la recherche des CCO, est réalisé immédiatement après leurs prélèvements au bloc opératoire à la loupe binoculaire équipée d'un plateau chauffant réglé à 37°C. Les CCO sont ensuite retirés du liquide folliculaire pour être transférés dans un milieu de culture adapté, puis déposés dans l'incubateur à 37°C (5,5% CO<sub>2</sub> et 5% O<sub>2</sub>) jusqu'à leur mise en fécondation. [5].

Les spermatozoïdes sont eux recueillis par masturbation, dans une salle de prélèvement prévue à cet effet, le jour de la ponction folliculaire, après un délai d'abstinence sexuelle compris entre 2 et 5 jours. Après liquéfaction à 37°C, les paramètres spermatiques sont évalués selon les normes de l'OMS révisées en 2010: numération, mobilité et vitalité [6]. La préparation du sperme la plus communément utilisée est la migration sur gradient de densité, elle permet d'éliminer les débris cellulaires ou acellulaires, les spermatozoïdes portant plusieurs anomalies morphologiques, les germes contenus dans le sperme, ainsi que les agglutinats. Les spermatozoïdes ainsi sélectionnés seront utilisés en FIV classique ou en ICSI. [7,8].

#### 1.1.2.2 La mise en fécondation

##### *1.1.2.2.1 La FIV classique*

Quelques heures après le recueil ovocytaire et la préparation des spermatozoïdes, les gamètes sont mis en présence dans des boîtes de culture embryonnaire contenant un milieu spécifique et sous incubateur.

Les indications de la FIV, depuis la naissance du premier « bébé éprouvette » en France en 1982, se sont élargies: endométriose, anomalies de l'ovulation et baisse de la réserve ovarienne prématurée. Sur le versant masculin, la prise en charge s'est également étendue aux altérations plus profondes des paramètres spermatiques ainsi qu'à la présence d'anticorps anti spermatozoïdes [9,10].

##### *1.1.2.2.2 La microinjection intra cytoplasmique du spermatozoïde (ICSI)*

L'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (*intracytoplasmic sperm injection* ou *ICSI*) est une technique de fécondation *in vitro* qui consiste à micro-injecter un spermatozoïde





dans le cytoplasme d'un ovocyte mature, grâce à une micro-aiguille encore appelée micro-pipette.

Elle nécessite au préalable de décoroniser, deux à trois heures après la ponction folliculaire, les CCO. La décoronisation consiste à éliminer la couronne de cellules de la granulosa entourant l'ovocyte (corona radiata et cumulus oophorus) par la combinaison d'une action enzymatique (hyaluronidase), et mécanique (pipetages répétés au travers d'un fin capillaire). Une fois l'ovocyte décoronisé, il est ensuite transféré dans un milieu de culture nouveau et équilibré pour être examiné. [11].

Cette technique mise au point au début des années 90 est indiquée en cas d'oligo-asthénospermie (OAT), d'azoospermie excrétoire et/ou sécrétoire, de nécrospermie totale et d'échec d'une tentative de FIV classique. [11].

#### 1.1.2.3 A J1: observation des ovocytes fécondés

L'observation des ovocytes intervient en général entre 18 et 22 heures après la FIV ou l'ICSI. Elle recherche les signes de fécondation à savoir la présence de deux pronoyaux et de deux globules polaires (Figure 1). [12].



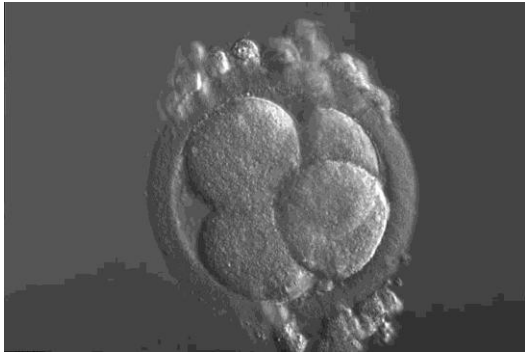
**Figure 1.** Zygote au stade de 2 pronoyaux (*D'après site CHU Besançon*)

#### 1.1.2.4 A J2 ou J3 : Observation et transfert embryonnaire

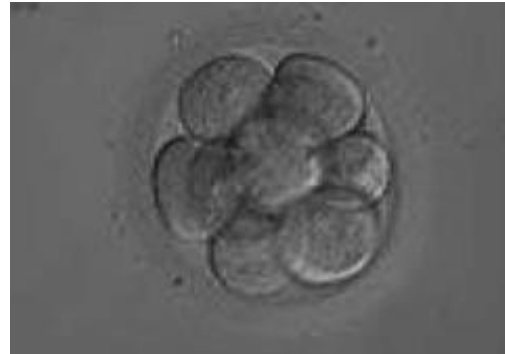
##### *1.1.2.4.1 Observation et transfert embryonnaire*

Quarante huit heures après la FIV ou l'ICSI (J2), les embryons ont atteint le stade de 4 blastomères et 8 blastomères à J3 (Figure 2).

À ce stade, la priorité est donnée à la sélection du meilleur embryon à transférer qui repose sur l'évaluation morphologique de certains paramètres: nombre, régularité, et homogénéité des blastomères, pourcentage de fragments cytoplasmiques. Différentes classifications morphologiques embryonnaires existent pour choisir l'embryons à transférer (voir Chapitre « Evaluation de la qualité embryonnaire »). [12].



A J2



A J3

**Figure 2.** Morphologie embryonnaire idéale à J2 (4 cellules), à J3 (8 cellules) et sans fragments (*selon ESHRE 2012*)

Le jour du transfert, les embryons sont montés dans un cathéter et sont transférés dans cavité utérine (sans toucher le fond utérin). Dans la grande majorité des cas, le transfert embryonnaire est écho-guidé et un test de grossesse s'effectue 12 à 14 jours après transfert par un dosage de  $\beta$ hCG plasmatiques.

#### *1.1.2.4.2 Devenir des embryons surnuméraires et la culture prolongée*

Après transfert embryonnaire, les embryons surnuméraires peuvent être congelés le jour même, si leur qualité le permet, ou peuvent être maintenus en culture prolongée (CP) jusqu'au stade de blastocyste à J5 ou J6 et être congelés à ce moment-là.

Dans le but d'améliorer le taux d'implantation, on peut envisager de prolonger la culture *in vitro* des embryons jusqu'au stade de blastocyste. La CP permettra d'identifier et d'éliminer les embryons dont la segmentation s'arrête après quelques divisions. [12].

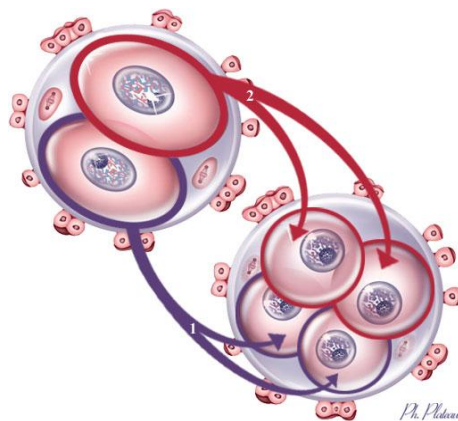
## 1.2 Première semaine de développement embryonnaire

### 1.2.1 Fécondation, stade zygote et clivé J2-J3

Le début de la période embryonnaire est marqué par la fécondation se caractérisant par la présence des pronoyaux (PN) maternel et paternel et l'expulsion du 2<sup>ème</sup> globule, phénomènes visibles 16 à 20h après FIV ou ICSI. C'est le stade de zygote (ou ovocyte fécondé). La fusion des PN s'appelle la syngamie et cause la première division de segmentation séparant le zygote en 2 cellules de taille identique, deux blastomères (Figure 3). C'est le stade du premier clivage ou clivage précoce qui survient entre 24 et 30 heures après la fécondation.

Le commencement du développement embryonnaire est lent. En effet, la deuxième division « stade 4 cellules » est sensiblement asynchrone; se manifestant par une phase transitoire menant à un stade 3 cellules pendant une durée approximative comprise entre une à deux heures.

Jusqu'à la troisième division de segmentation (stade 8 cellules), les divisions cellulaires sont identiques, mais s'effectuent sans régularité dans l'orientation des plans de division. Ces divisions cellulaires se produisent relativement lentement (une division toutes les 24 heures). [13].



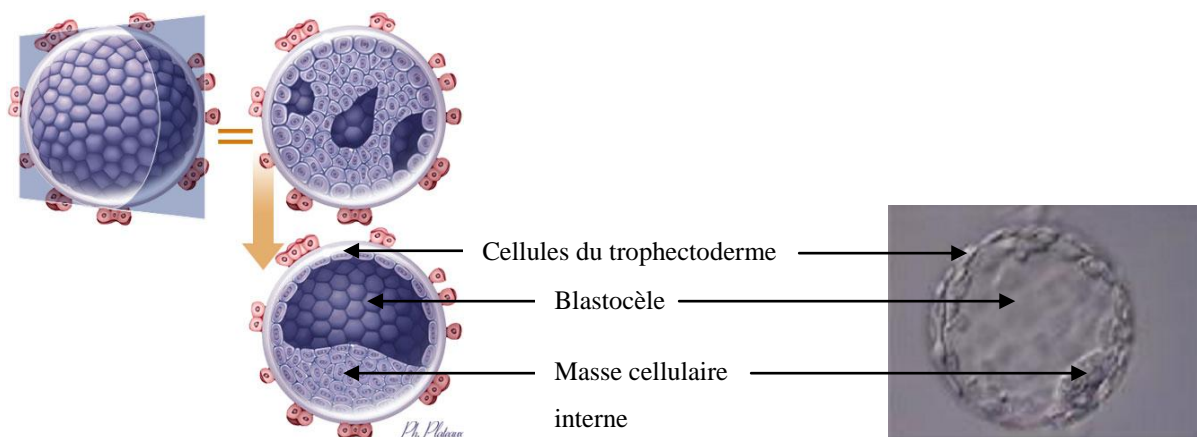
**Figure 3.** La segmentation (D'après *L'embryogenèse humaine*, D.Rabineau, J.M. Dupont, P. Plateaux)

## 1.2.2 Formation et compaction de la morula

Entre les stades 8 et 16 blastomères, on parle de morula. Sa compaction a lieu après le stade 8 cellules (environ 4 jours après la fécondation), et correspond à l'acquisition d'une polarité cellulaire et à la différenciation des deux premiers types de cellules embryonnaires: la masse cellulaire interne (bouton embryonnaire) et la couronne de trophoblaste (trophectoderme). [14, 15].

## 1.2.3 Formation et éclosion du blastocyste

Vers le 5<sup>ème</sup> jour (entre les stades 32 et 64 blastomères), la première cavité embryonnaire (blastocèle) se forme à l'intérieur de la morula par la confluence de micro-sécrétions trophoblastiques, et s'intercale entre la masse cellulaire interne et le trophoblaste (Figure 4). Dès lors, la morula prend le nom de blastocyste.



**Figure 4.** Stade J5-J6 : formation du blastocyste (*D'après L'embryogenèse humaine, D.Rabineau, J.M. Dupont, P. Plateaux*)

Après sa formation, le blastocyste subit une phase d'expansion d'amplitude par l'afflux de liquide dans le blastocèle. Dans la zone pellucide se forme progressivement des orifices permettant au blastocyste de s'échapper: c'est l'éclosion qui se produit au 6<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire. Seuls les blastocystes éclos peuvent s'implanter par un contact direct entre les cellules du trophoblaste et celles de l'endomètre. [14, 15]. (Figure 5).

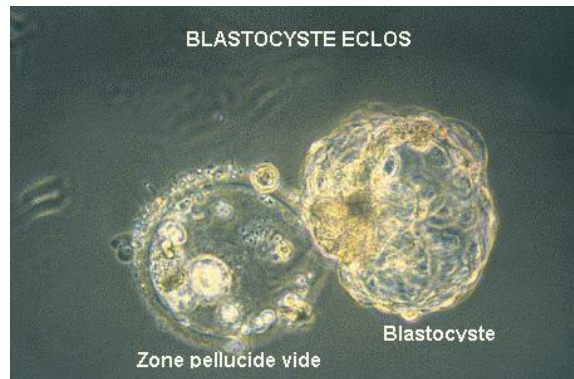


Figure 5. Eclosion de blastocyste (D'après le site du CHU Toulouse)

### 1.3 Politique de transfert mono-embryonnaire

Le jour du transfert embryonnaire n'est pas consensuel. Ainsi, selon les centres d'AMP, le transfert frais est réalisé au stade clivé à J2-J3 ou au stade blastocyste à J5-J6. [16, 17].

La comparaison entre le transfert frais à J2/J3 versus J5/J6 a fait l'objet de nombreuses études qui vont toutes dans le même sens: le transfert au stade blastocyste permet d'obtenir des taux d'implantation, de grossesses cliniques et d'accouchements significativement plus importants [18, 19]. Toutefois, les taux cumulés de grossesse, prenant en considération les transferts d'embryons frais et congelés, sont équivalents que ce soit à J2/J3 ou à J5/J6 mais avec des délais plus courts en faveur du blastocyste. [20].

#### 1.3.1 Intérêts de la Culture prolongée

- **Diminuer le risque de grossesses multiples:** à l'heure actuelle, l'un des problèmes majeurs de l'AMP est le taux élevé de grossesses multiples (18,6% en 2012) associées à une incidence accrue de morbidité et mortalité maternelle, néonatale et périnatale. Afin de le réduire, l'European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), recommande depuis l'an 2000 le transfert mono embryonnaire (TME) sous certaines conditions (âge féminin inférieur à 34 ans, rang de transfert et qualité embryonnaire). [21]. De nombreux auteurs rapportent, avec le TME, de bons taux d'accouchement combinés à une diminution significative du nombre de grossesses multiples. [22, 23, 24].



- **Échecs répétés de transfert à J2:** pour les patientes n'ayant pas obtenu de grossesses après plusieurs transferts d'embryons de bonne qualité à J2 ou J3, le transfert de blastocyste permet d'augmenter les chances de grossesse clinique notamment par un transfert plus « physiologique ». En effet le blastocyste, étant naturellement à ce stade dans l'utérus, permet d'optimiser la synchronisation entre l'embryon et l'endomètre. [25].
- **Analyse de l'aptitude au développement des embryons:** lorsqu'une anomalie de qualité ovocytaire est suspectée, la culture prolongée permet d'évaluer l'aptitude des zygotes à se développer. De plus, la culture permet une sélection cytogénétique des embryons (la moitié des embryons bloqués *in vitro* sont porteurs d'anomalies cytogénétiques à type d'aneuploïdies). [26].
- **Congélation des embryons:** lorsque certains embryons ne répondent pas aux critères d'évaluation morphologiques nécessaires pour être congelés à J2/J3 (retard important de clivage, fragmentation cellulaire importante), ils peuvent être congelés ultérieurement en étant cultivés jusqu'au stade de blastocyste. [27].
- **Recommandation légale :** En raison de nombreux embryons « orphelins » séjournant dans les cuves d'azote et rendant délicat leurs conditions de stockage et leur destruction, l'Agence de la Biomédecine (ABM) recommande fortement de moins congeler d'embryons. De manière générale, la CP permet une sélection des meilleurs embryons à congeler et de limiter ainsi la cryoconservation embryonnaire. [27].

### 1.3.2 Les limites de la culture prolongée

La qualité de la culture prolongée est étroitement liée au niveau d'équipement du laboratoire d'AMP en incubateurs optimisés et coûteux. Elle confère ainsi une balance bénéfice/risque/coût défavorable sur le plan technique. De plus, le taux de blastoformation totale (obtention de blastocystes à partir d'embryons J2/J3) n'est que d'environ 50%. Et la blastoformation utile (blastocyste de bonne qualité) n'est que de 30%. [28].

Un même incubateur, où séjournent des embryons des différents couples, peut être amené à être ouvert à plusieurs reprises au sein d'une journée. Ces ouvertures répétées, exposent les embryons à des variations de températures et de lumière qui peuvent impacter négativement leur développement. En conséquence, un nombre élevé d'incubateurs est exigé pour ne pas soumettre les embryons aux variations nuisibles de leurs conditions de culture.

Par ailleurs, la composition de l'atmosphère, soit plus particulièrement l'hypoxie, dans les incubateurs influe positivement la blastoformation. Cependant, le coût de ce type d'enceinte thermique reste onéreux.

Enfin, la mise en place d'une politique de TME nécessite en parallèle une grande efficacité du programme de congélation embryonnaire.

Deux techniques de congélation existent: la congélation lente et la vitrification.

### **1.3.3 La congélation embryonnaire**

L'une des principales problématiques en cryobiologie est la prévention de la formation de cristaux de glace intra et extracellulaires responsables, lors du processus de refroidissement, de lésions et de lyses cellulaires, et ce notamment par les phénomènes osmotiques qu'ils engendrent. Ainsi, la première étape avant toute congélation consiste à exposer les cellules à des cryoprotecteurs intracellulaires (éthylène glycol, DMSO, propanediol) et extracellulaires (sucrose, tréhalose, saccharose), solutions visqueuses, réduisant rapidement la cristallisation par leurs propriétés déshydratantes en intra et extracellulaire avant le refroidissement. Après introduction des embryons dans des dispositifs adaptés (paillettes), la seconde étape consiste à refroidir et à conserver jusqu'à  $-196^{\circ}\text{C}$  les cellules en les plongeant dans l'azote liquide.

Dans la congélation lente, la descente de température, dans l'enceinte d'un congélateur automatisé, est lente et progressive à partir de  $20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à  $-160^{\circ}\text{C}$  sur une durée de 3 heures environ. Les résultats en termes de taux de survie, de développement embryonnaire, de grossesse et d'accouchement par cette méthode sont satisfaisants mais restent significativement inférieurs à ceux obtenus en vitrification. [29].

Le concept de la vitrification élaboré au cours des années 1990 a permis par la suite les premières vitrifications embryonnaires en 2000. A la différence de la congélation lente, cette technique empêche le phénomène de cristallisation en exposant les cellules à de fortes concentrations en cryoprotecteurs, avant un refroidissement ultra-rapide de plus de  $20\ 000^{\circ}/\text{min}$  ( $20^{\circ}\text{C}$  à  $-196^{\circ}\text{C}$  en une seconde) par plongée directe dans l'azote liquide. [30, 31].

## 1.4 Evaluation de la qualité embryonnaire

Actuellement, l'évaluation de la qualité embryonnaire reste encore essentiellement basée sur des critères morphologiques. Différents paramètres ont été proposés pour permettre une meilleure sélection embryonnaire: le clivage de l'embryon, comprenant également le clivage précoce, la taille et la multinulcéation des blastomères, et l'existence d'une fragmentation.

L'étude morphologique des pronoyaux améliore l'évaluation de stades embryonnaires précoces. [32]. La capacité de développement *in vitro* de l'embryon vers le stade de blastocyste est également proposée comme un indicateur du potentiel d'implantation de l'embryon. [33]. (Annexe 1: illustrations des stades de développement embryonnaire de bonne et de mauvaise qualité).

### 1.4.1 Cinétique de développement embryonnaire *in vitro* et qualité embryonnaire

L'évaluation de la qualité embryonnaire inclut l'observation des pronoyaux après la fécondation de l'ovocyte à J1, l'étude du statut zygotique à la 25<sup>ème</sup> heure ainsi que l'analyse morphologique de l'embryon au stade clivé à J2/J3 voire du blastocyste à J5/J6 avant son transfert ou sa congélation.

#### 1.4.1.1 Analyse de pronoyaux (J1)

En 1998, Scott et Smith publient la première classification du zygote. Elle compare la taille et la situation des pronucléi en incluant le nombre, la taille et l'alignement des précurseurs nucléolaires (PN). En 2000, cette classification est revisitée, sous l'appellation de « Z-score », en incorporant la capacité des embryons à atteindre le stade blastocyste. [34].

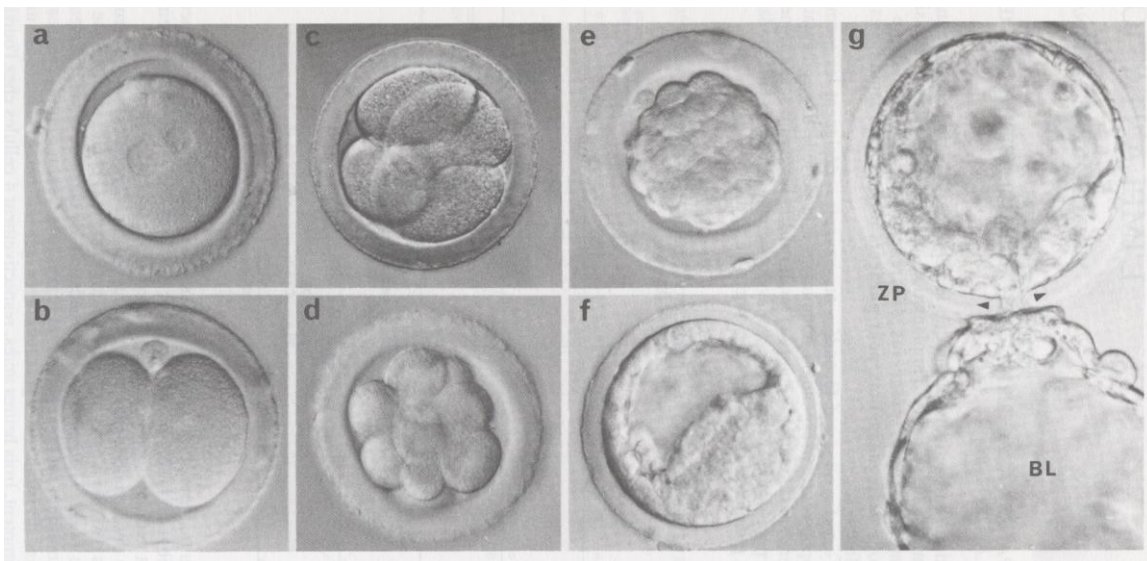
#### 1.4.1.2 Evaluation du clivage embryonnaire (J2/J3)

Les critères les plus couramment pris en compte dans l'évaluation du clivage et de la qualité embryonnaire sont basés sur le nombre et l'uniformité des blastomères, leur taille, l'existence d'une fragmentation cytoplasmique et la présence de blastomères multinucléés. [35].



#### 1.4.1.2.1 Cinétique de clivage

Un embryon de bonne qualité est clivé en 2 cellules à la 25<sup>ème</sup> heure (clivage précoce) et doit posséder 4 blastomères à J2 et 8 à J3. Le transfert d'embryon clivé précocement augmente de manière significative le taux de grossesse. Plusieurs auteurs rapportent qu'une croissance trop rapide ou bien trop lente, conduisant à des embryons ayant une cellularité différente à J2 et J3, amène à des taux d'implantation et de grossesse moindres. (Figure 6). Ce type de croissance s'associe de même à des anomalies chromosomiques de l'embryon de type mosaïques ou aneuploïdies. [36, 37].



**Figure 6.** Cinétique de développement embryonnaire : **a)** 19 heures, une cellule ; **b)** 24 heures, deux cellules ; **c)** 35 heures, quatre cellules ; **d)** 48 heures 8-10 cellules ; **e)** 72 heures, stades morula ; **f)** 96 heures, blastocyste en formation ; **g)** 110 heures, blastocyste (BL) en éclosion hors de la zone pellucide (ZP) ; point de rupture de la zone pellucide entre les 2 points de flèche (D'après *La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme*, C.Thibault,., *Ellipses*)

#### 1.4.1.2.2 Taille des blastomères: typicité

Un clivage inégal de l'embryon, responsable d'une cellularité différente de celle attendue sur le plan de la taille et de l'homogénéité, est à l'origine d'une diminution du taux d'implantation et de grossesse après son transfert. [38].

#### 1.4.1.2.3 L'existence d'une fragmentation



L'évaluation de la qualité embryonnaire incorpore également le pourcentage de fragments cytoplasmiques dans l'embryon, dont la cause et le rôle sont actuellement encore mal définis. Des nombreuses études montrent qu'un haut degré de fragmentation s'associe à des taux d'implantation diminués. Toutefois ce phénomène est réversible, les fragments cellulaires pouvant être résorbés au sein de blastomères nouvellement clivés.

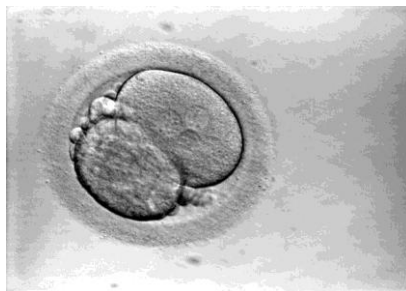
Le type de fragment est aussi un facteur de viabilité et de qualité embryonnaire: plus les fragments sont de grandes tailles, plus ils affectent le potentiel d'implantation. Ainsi de petits fragments localisés peuvent ne pas affecter pas ce potentiel. (Figure 7). [39].



**Figure 7.** Fragments cellulaires au sein d'un embryon de 2 cellules (< 50% de la surface totale : embryon de type C2). (Selon ESHRE 2012)

#### 1.4.1.2.4 Statut nucléaire des blastomères

La multinuléation des blastomères, soit la présence anormale non pas d'un seul noyau mais de plusieurs, a récemment été prise en considération dans l'évaluation du potentiel implantatoire de l'embryon. (Figure 8.). Des analyses génétiques, révélant une élévation des taux d'aneuploïdie, d'anomalies chromosomiques et de défauts dans la synthèse d'ADN, sont à l'origine d'une baisse des taux de grossesses et d'implantation après leur transfert. [38].



**Figure 8.** Blastomère multinucléé (3 noyaux) dans un embryon à 2 cellules. (Selon ESHRE 2012).

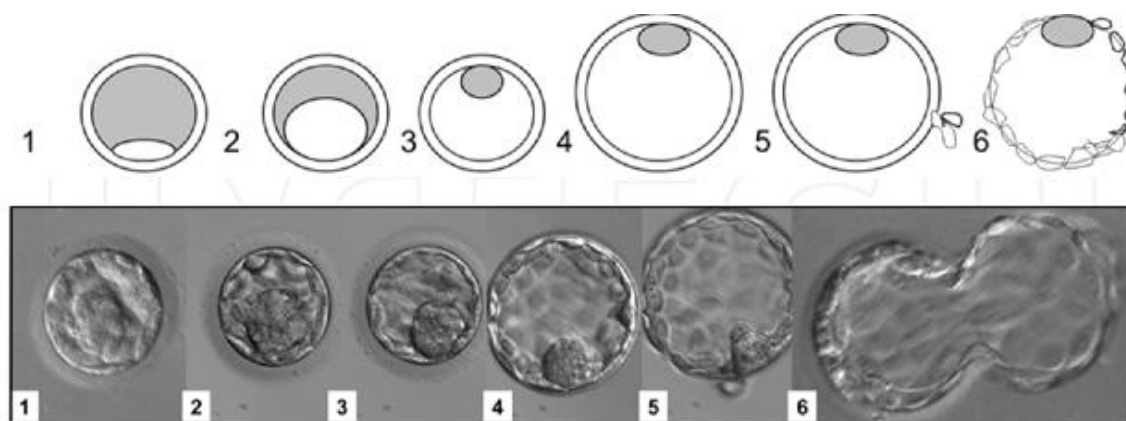
#### 1.4.1.2.4 Scores embryonnaires

Actuellement différents systèmes de scores embryonnaires, évaluant la qualité morphologique des différents stades de développement *in vitro*, existent allant ainsi d'une simple analyse des pronoyaux issus de la fécondation 18 heures après insémination des gamètes, à l'étude du zygote à la 25<sup>ème</sup> heures, et enfin à l'aspect global de l'embryon le jour du transfert au 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> jour de son développement. Ces scores ont pour objectifs d'améliorer l'évaluation de la viabilité et de la qualité embryonnaire.

Cependant, aujourd'hui chaque centre d'AMP évalue la qualité embryonnaire en fonction de critères dont la pertinence est jugée et qui sont propres à leurs laboratoires. Cela a pour principale conséquence une absence de standardisation globale des scores embryonnaires. Néanmoins, plus les critères d'analyse sont nombreux plus l'évaluation, visant à sélectionner les meilleurs embryons en vue d'un transfert unique si possible, est fine. [40].

#### 4.1.1.3 La qualité du blastocyste

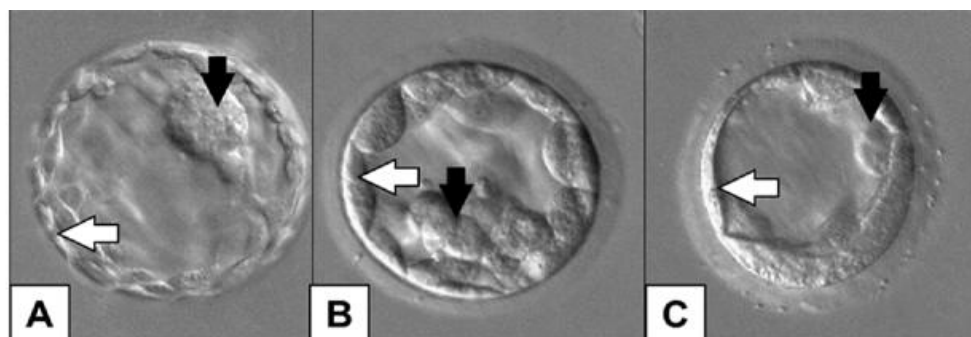
Son évaluation est basée sur la classification de Gardner et Schoolcraft. Elle prend en compte le degré d'expansion du blastocyste (B1 à B6) ainsi que l'aspect de la masse cellulaire interne et du trophoctoderme (à partir de B3): [41].



**Figure 9:** Evolution du blastocyste (*selon Gardner & Schoolcraft, 1999*).

- 1) B1: le blastocèle occupe moins de 50% du volume embryonnaire
- 2) B2: le blastocèle occupe 50% ou plus du volume embryonnaire
- 3) B3: blastocyste en voie d'expansion

- 4) B4: blastocyste expansé
- 5) B5: blastocyste en voie d'éclosion
- 6) B6: blastocyste éclos



**Figure 10:** Masse cellulaire interne et trophoctoderme du blastocyste (selon Gardner & Schoolcraft, 1999).

	<b>Bouton embryonnaire/ masse cellulaire interne</b>	<b>Trophoctoderme</b>
A	Compacte, nombreuses cellules	Nombreuses cellules formant un épithélium
B	Légèrement regroupé en plusieurs cellules	Peu de cellules et peu cohésives
C	Très peu de cellules	Très peu de cellules, larges

**Tableau 1:** Classification du bouton embryonnaire et du trophoctoderme du blastocyste selon Gardner

Gardner et al. définissent un score au stade blastocyste donnant les meilleurs taux d'implantation et de grossesse: 3 AA désigné aussi le nom de « top quality blastocyst ». [41].

Les critères de classification des blastocystes ont fait l'objet d'études. Un blastocyste expansé montre un taux d'implantation après transfert frais plus important qu'un blastocyste non expansé. Ce phénomène est d'autant plus présent à J5 qu'à J6. [49, 50]. Le degré d'expansion représente un des critères de qualité les plus importants avant transfert frais ou congelé.

De plus, une masse cellulaire interne (ICM), comportant un nombre élevé de cellules (grade A ou B) et un épithélium cohésif du trophoctoderme (grade A ou B) contribuent à augmenter le taux d'implantation et de naissance. [42, 43, 44].



## 1.4.2 Les limites de la morphologie embryonnaire

L'évaluation de la qualité embryonnaire basée sur la morphologie reste à ce jour le moyen le plus utilisé par la plupart des laboratoires d'AMP. Elle présente toutefois des limites.

L'un des obstacles majeurs identifié est l'absence de standardisation de cette évaluation, malgré la rédaction en 2011 du consensus d'Istanbul par l'ESHRE. [45]. La variabilité au sein des pratiques des laboratoires d'embryologie n'est donc pas négligeable. Elle s'explique en grande partie par la subjectivité des observateurs ayant des formations et entraînements qui leurs sont propres. La valeur prédictive de la morphologie embryonnaire peut ainsi être fortement perturbée par des variabilités intra et inter opérateurs, conduisant à une forte diversité des embryons sélectionnés.

De plus, l'évaluation n'est pas toujours faite au même moment. Elle représente une « photo » de l'embryon à un moment bien précis, pouvant être différente quelques heures avant ou après son évaluation. La valeur prédictive de la morphologie de l'embryon à J2-J3 quant à l'obtention d'un blastocyste et de son implantation reste donc limitée. [46].

Enfin, parmi les embryons définis comme présentant une mauvaise qualité, un certain nombre d'entre-eux atteignent le stade de blastocyste et s'implantent pour aboutir à des grossesses évolutives et des naissances. Ce constat démontre également une des principales limites de l'évaluation morphologique de la qualité embryonnaire. [47, 48, 49, 50].

De même, quelques auteurs considèrent l'intérêt de conserver tous les embryons surnuméraires au stade clivé étiquetés, « non viables », dans la mesure où en culture prolongée ils sont capables de former des blastocystes.

Une question se pose alors : des embryons de mauvaise qualité (EMQ) ne seraient-ils pas écartés à tort de la culture embryonnaire et détruits alors qu'ils pourraient donner des grossesses et des naissances ?

Notre étude avait pour objectif de connaître le devenir des embryons surnuméraires en culture prolongée quelques soit leur qualité à J2 avec une attention particulière portée aux EMQ en termes de blastoformation totale et utile.



De plus, elle devait également statuer sur le potentiel d'implantation et de grossesse évolutive des blastocystes obtenus à partir d'EMQ.

## **2 SECONDE PARTIE: PRÉSENTATION DE L'ÉTUDE ET DES RÉSULTATS**

### **2.1 Matériel et méthode**

#### **2.1.1 Type d'étude**

Une étude rétrospective uni-centrique a été menée, du 1er novembre 2012 au 1er juillet 2014, parmi les couples pris en charge en AMP au Centre Hospitalo-Universitaire Cochin/Port Royal.

#### **2.1.2 Population d'étude**

Du 1<sup>er</sup> novembre 2012 au 1<sup>er</sup> juillet 2014, 2043 tentatives de FIV et ICSI ont été réalisées dans notre centre. Pour notre étude, seules les tentatives avec transfert embryonnaire frais à J2 ont été incluses soit un total de 1237.

Après stimulation et ponction ovarienne, la fécondation a été réalisée par FIV classique ou ICSI. Deux jours plus tard, le transfert d'un ou de deux embryons frais a été effectué. Les embryons surnuméraires ont été maintenus en culture prolongée quelque soit leur qualité à J2. Les blastocystes obtenus et présentant une qualité satisfaisante ont été congelés par la technique de vitrification à J5 ou J6.

Ainsi, notre étude porte sur l'analyse de 3108 embryons surnuméraires issus de FIV et d'ICSI mis en CP.

##### **2.1.2.1 Stimulation et ponction ovarienne**

Dans la majorité des cas, un protocole court de stimulation a été utilisé. Après une phase de blocage par pilule, la stimulation ovarienne a été initiée par l'administration de FSH recombinante.



La croissance folliculaire a été suivie par monitoring échographique et dosage hormonal. Le déclenchement de l'ovulation a été effectué par l'administration d'hCG et la ponction ovarienne réalisée 34 à 36 heures plus tard, au bloc opératoire sous contrôle échographique.

#### 2.1.2.2 Fécondation et culture embryonnaire

Au terme des 2-3 heures d'incubation des CCO, le choix de la technique de fécondation (FIV ou ICSI), a été déterminé après évaluation des paramètres spermatiques après sélection sur gradient de densité. Les signes de fécondation ont été recherchés environ 17 à 19h après mise en fécondation et confirmés par la présence de 2 pronoyaux et de 2 globules polaires. La culture embryonnaire a été réalisée individuellement en microgouttes de 20 µl. Au stade clivé (J2), l'évaluation de la qualité embryonnaire a été effectuée en prenant en considération le nombre de blastomères, le degré de fragmentation, la typicité du clivage ainsi que le statut nucléaire des blastomères à la recherche d'une multinucléation. Ainsi et en accord avec les données de la littérature, les embryons de bonne et mauvaise qualité ont été déterminés comme suit:

##### Stade clivé J2-J3:

- **J2-Bonne qualité:** 4-5 cellules, moins de 10 % de fragmentation ou entre 10-30%, blastomères typiques et absence de multinucléation.
- **J2-Mauvaise qualité:** <4 cellules ou >6 cellules, fragmentation comprise entre 30-50% et >50%, blastomères atypiques et présence ou absence de multinucléation.

#### 2.1.2.3 Transfert d'embryons frais

Le transfert intra utérin d'un ou de deux embryons frais a été réalisé à J2 à l'aide d'un cathéter de transfert souple et sous contrôle échographique. Les embryons transférés présentaient la meilleure qualité à J2.

#### 2.1.2.4 Embryons surnuméraires et culture prolongée

La CP des embryons surnuméraires a été réalisée individuellement en microgouttes de 50 µl quelque soit la qualité à J2.





Les blastocystes obtenus à J5 ou J6 ont été classés qualitativement selon la classification de Gardner (cf tableau 1) basée sur le degré d'expansion du blastocèle, l'aspect de la masse cellulaire interne et le trophoctoderme.

Les blastocystes présentant une qualité satisfaisante ont été congelés par vitrification à J5 ou J6, en accord avec les données de la littérature comme suit :

- **J5/J6-Bonne qualité:**
  - B3 AA/AB/BA/BB
  - B4 AA/AB/BA/BB
  - B5 AA/AB/BA/BB
- **J5/J6-Mauvaise qualité:**
  - B3 CC
  - B4 CC
  - B5 CC
- Cas particuliers :
  - B3, B4 et B5 avec un « C » soit pour la masse cellulaire interne soit pour le trophoctoderme.

Seuls les blastocystes de bonne qualité à J5 ou J6 ainsi que quelques cas particuliers dépendant du contexte clinique ainsi que du faible rendement embryonnaire ont été vitrifiés.

#### 2.1.2.5 Décongélation et transfert

La préparation de l'endomètre a été obtenue par administration d'estrogènes et de progestérone. Le jour du transfert, un seul blastocyste a été décongelé 2 à 3 heures avant son transfert intra utérin. En cas de nécrose du blastocyste lors de la décongélation, un second était décongelé en vue de son transfert. Seuls les blastocystes ayant résisté à la congélation ont été transférés in utero sous contrôle échographique.

Un dosage plasmatique de  $\beta$ hCG dix jours après le transfert était réalisé en vue d'objectiver un début de grossesse. La grossesse clinique a été définie à l'échographie par la présence d'un sac gestationnel avec activité cardiaque à la 7<sup>ème</sup> semaine.



### **2.1.3 Présentation de l'outil, mode de recueil**

Les données ont été extraites à partir du dossier médical informatisé dans le logiciel spécifique Medifirst et transférées sur un fichier Excel avant analyse.

### **2.1.4 Critères d'inclusion et d'exclusion**

#### 2.1.4.1 Critères d'inclusion

Tous les embryons surnuméraires issus de FIV et d'ICSI après transfert frais à J2 ont été inclus.

#### 2.1.4.2 Critères d'exclusion

Les couples ayant bénéficié d'une CP de la totalité de la cohorte embryonnaire sans transfert frais à J2 ont été exclus de l'analyse.

Par ailleurs, l'absence de blastocystes au stade B6 de la classification de Gardner dans l'analyse s'explique par l'absence de vitrification à ce stade puisqu'elle a été réalisée avant l'éclosion complète.

### **2.1.5 Critère principal et secondaire d'évaluation**

#### 2.1.5.1 Critère principal de jugement

Les critères de jugement principaux étaient:

- Le taux de blastoformation totale, soit le nombre total de blastocystes obtenus à J5 et J6 quelque soit leur qualité en FIV et en ICSI.
- Le taux de blastoformation utile, soit le nombre total de blastocystes de bonne qualité et congelés à J5 et J6 y compris les cas particuliers en FIV et en ICSI.

### 2.1.5.2 Critère secondaire de jugement

Les critères de jugement secondaires étaient:

- Le taux de grossesse clinique, défini comme la présence d'un sac gestationnel intra-utérin et d'une activité cardiaque.
- Le taux d'accouchement
- Le taux de fausse couche spontané (FCS), précoce ou tardif
- Le taux d'interruption de grossesse pour raison médicale : grossesse extra-utérine (GEU), interruption médicale de grossesse (IMG), mort fœtale in utéro (MFIU).

### 2.1.6 Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à partir du logiciel Excel. Des tests de Student ont été utilisés pour les comparaisons des moyennes (variables quantitatives) et des tests de Chi2 pour les comparaisons des variables qualitatives.

Les paramètres pour lesquels les seuils de signification (p) étaient inférieurs à 0,05 ont été considérés comme significativement différents.

Les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel en ligne VASSARStats.

## 2.2 Résultats

### 2.2.1 Description de la population générale

Au total, 3108 embryons ont été mis en culture prolongée dont 1319 issus de FIV et 1789 d'ICSI.

L'âge moyen des patientes était significativement plus bas dans le groupe ICSI (33.8 vs 34.5 ans). Les taux de blastoformation totale (J5+J6) étaient équivalents en FIV et en ICSI (56,6% vs 53,2%). A l'inverse, le taux de blastoformation utile (blastocystes congelés J5+J6) était significativement plus élevé en FIV (28.7% vs 25%) (Tableau 1.1).

**Tableau 1.1:** Ages patientes, taux de blastoformation totale et utile en FIV et ICSI

	FIV	ICSI	P
Age des patientes	34,5	33,8	3,36283E-05
Nombre d'embryons mis en culture prolongée	1319	1789	
Nombre total blasto J5 (%)	746 (56.6%)	952 (53.2%)	P=0.542
Nombre blasto congelés (%)	379 (28.7%)	448 (25%)	P= 0.034

Nous avons voulu connaître l'influence des différents paramètres de qualité embryonnaire à J2 sur la blastoformation utile à J5 et J6. Ces paramètres ont été analysés individuellement.

Ainsi, les tableaux 2 à 5, expriment les taux de blastoformation utile en fonction du nombre de cellules, du degré de fragmentation, de la typicité et de la multinucléation des blastomères à J2.

La majorité des blastocystes congelés provenaient d'embryons présentant une cinétique de clivage optimale pour le jour d'observation (J2) et de manière équivalente dans les deux groupes (73.6% en FIV vs 76.3% en ICSI). Cependant, une différence significative a été observée entre la FIV et l'ICSI concernant les embryons en retard de clivage (2-3 cellules : 20% vs 11%) et ceux en avance (>5 cellules : 6.3% vs 12.7%) en raison d'une différence de distribution dans ces 2 sous groupes (Tableau 1.2).

**Tableau 1.2 :** Blastoformation en fonction du nombre de cellules à J2

	FIV	ICSI	p
2-3 cellules	76 (20%)	49 (11%)	<0.001
4-5 cellules	279 (73.6%)	342 (76.3%)	
>5 cellules	24 (6.3%)	57 (12.7%)	

De la même manière, la majorité des blastocystes congelés provenait d'embryons ne présentant pas ou peu de fragmentation à J2.

Une différence significative entre FIV et ICSI a été observée, là aussi en raison d'une différence de distribution des embryons (<10% : 23.4% vs 31.5% ; 10-30% : 63.1% vs 54.7%) (Tableau 1.3).

**Tableau 1.3:** Blastoformation en fonction du degré de fragmentation à J2

	FIV	ICSI	p
<10% (%)	89 (23.4%)	141 (31.5%)	0.043
10-30%	239 (63.1%)	245 (54.7%)	
30-50%	45 (11.9%)	58 (12.9%)	
>50%	6 (1.6%)	4 (0.9%)	

Concernant la typicité des embryons à J2, celle-ci n'influe pas sur la blastoformation utile puisque la distribution des embryons typiques et atypiques était équivalente ainsi qu'en FIV et ICSI (Tableau 1.4).

**Tableau 1.4:** Blastoformation en fonction du caractère typique ou atypique des blastomères à J2.

	FIV	ICSI	p
Typique	176 (46.4%)	214 (47.8%)	0.699
Atypique	203 (53.6%)	234 (52.2%)	

Comme pour la cinétique de clivage et le degré de fragmentation, la multinucléation influence le potentiel de blastoformation utile puisque la majorité des blastocystes congelés provenait d'embryons ne présentant aucune multinucléation à J2, et elle était équivalente en FIV et ICSI (94.7% vs 94.9%) (Tableau 1.5).

**Tableau 1.5:** Blastoformation en fonction de la multinucléation à J2

	FIV	ICSI	p
0 BMN	359 (94.7%)	425 (94.9%)	0.331
1 BMN	17 (4.5%)	15 (3.3%)	
>1 BMN	3 (0.8%)	8 (1.8%)	

Au total, 211 blastocystes ont été décongelés dont 105 issus de FIV et 106 issus d'ICSI ayant donné lieu à 210 transferts mono embryonnaires (104 issus de FIV et 106 issus d'ICSI). Les taux de grossesse clinique, d'accouchement, de fausse couche et d'interruption de grossesse pour raison médicale étaient équivalents entre la FIV et l'ICSI (Tableau 1.6).

**Tableau 1.6** : Issues des décongelations des blastocystes

	FIV	ICSI	P
Nb de blasto décongelés	100	111	
Taux de survie	100%	100%	1
Nb blasto transférés	100	111	
Nb de grossesses cliniques (%)	39 (39%)	48 (43.2%)	0.532
<i>Nb de grossesses évolutives en cours (%)</i>	<i>15 (14.4%)</i>	<i>10 (20.8%)</i>	<i>0.028</i>
<i>Nb d'accouchements (%)</i>	<i>8 (20.5%)</i>	<i>24 (50%)</i>	
<i>Nb de FCS (%)</i>	<i>12 (30.8%)</i>	<i>12 (25%)</i>	
<i>Nb de GEU/IMG/MFIU (%)</i>	<i>4 (10.3%)</i>	<i>2 (4.2%)</i>	

### 3 TROISIÈME PARTIE: DISCUSSION

Notre étude confirme les données rapportées dans la littérature concernant l'évaluation morphologique de la qualité embryonnaire. L'ensemble de ces études confirment la corrélation entre le l'aspect morphologique de l'embryon au stade clivé (J2 ou J3) et le potentiel de développement jusqu'au stade de blastocyste. Ainsi, la plupart des scores embryonnaires décrits dans la littérature décrivent de manière consensuelle la morphologie embryonnaire optimale conditionnant l'obtention de blastocystes à J5 ou J6. Idéalement, un embryon au stade clivé doit présenter :

- 4 cellules à J2 et 8 cellules à J3.
- une absence de fragmentation cellulaire
- une absence de multinucléation

Les résultats de notre étude sont en accord avec ceux décrits dans la littérature et confirment cette corrélation. Seule la typicité du clivage ne semble pas montrer d'impact sur la blastoformation dans nos conditions.

A l'inverse, une avance prononcée du clivage (plus de 6 cellules à J2 et 10 cellules à J3) ou un retard (moins de 4 cellules à J2 et 6 cellules à J3), une fragmentation élevée, supérieure à 30% voire 50%, des blastomères atypiques et une multinucléation importante (>50%) définissent les embryons de mauvaise qualité (EMQ) et représentent des facteurs de mauvais pronostic dans le développement embryonnaire. Là encore, nos résultats confirment les données existantes en allant dans le même sens. [36, 37, 38, 39].

Ainsi, Guérif et al. (2009) ont pu montrer des taux de blastoformation significativement supérieurs, à partir d'embryons présentant les caractéristiques morphologiques optimales à J2, sur 2617 embryons mis en culture prolongée en vue d'un transfert frais au stade blastocyste. [51].



Dans son étude sur 1000 embryons, Rienzi (2005) montre que des embryons de bonne qualité ont 80% de chance d'atteindre le stade blastocyste et 56,2% de chance de s'implanter lors d'un transfert mono embryonnaire (TME). A l'inverse, les EMQ présentent des taux de blastoformation et d'implantation significativement plus bas (21,8% et 20% respectivement). [52].

Ces observations ont été confirmées quelques années auparavant avec les travaux de Ziebe en 1997 et de Fisch en 2001 pour les embryons J3 en obtenant des taux de blastoformation et d'implantation significativement plus élevés à partir d'embryons de bonne qualité à J2 ou J3 (score 90-100, 64% de blastocystes formés vs score 30-65, 11%). [53, 54].

A ce jour, la morphologie reste donc un outil solide et nécessaire à la sélection embryonnaire avant transfert ou congélation. Toutefois elle confirme également ses limites.

En effet, la littérature reste controversée sur certains critères morphologiques qui ne cessent d'être remis en cause, notamment en multipliant les scores embryonnaires.

Ainsi, la multinucléation est un phénomène commun. Elle peut être observée chez environ 34% des embryons J2-J3, et s'estomper au cours du développement pour corriger des aneuploïdies chez 20 à 30% des blastocystes à l'issue de leur culture prolongée. [39].

Par ailleurs, il est admis qu'un haut degré de fragmentation est corrélé négativement avec l'implantation et le taux de grossesse clinique et évolutive. A l'inverse, certains embryons fragmentés seront à l'origine de naissances. Ce constat réside en grande partie dans le manque de connaissances approfondies concernant le phénomène de fragmentation. De nombreux auteurs ont confirmé son caractère réversible au cours du développement. En effet, certaines investigations ont fait part d'une pseudo-fragmentation correspondant à l'apparition transitoire pendant les divisions cellulaires et non détectée lors du développement postérieur. [13, 38, 39].

Une étude rétrospective de séries de cas (Stecher et al. 2014), menée par surveillance vidéo des embryons (*time-lapse*), appuie les remaniements possibles de la morphologie et donc la plasticité évolutive embryonnaire. [55].

Notre étude confirme également ces observations rapportées par ces différents auteurs puisque des taux de blastoformation ont été obtenus à partir d'embryons J2 ayant présenté un retard de clivage (20% en FIV et 11% en ICSI) ou, à l'inverse, une avance (6,3 % en FIV et 12,7% en





ICSI), une fragmentation élevée comprise entre 30-50% (11,9% en FIV et 12,9% en ICSI), et enfin des blastomères atypiques (53,6% en FIV et 52, 2% en ICSI).

Faces à ces limites de l'évaluation morphologique de la qualité embryonnaire aux stades clivés, la culture prolongée représente un moyen supplémentaire de sélection des embryons.

Il est admis qu'environ 50% des embryons de bonne qualité à J2-J3 atteindront le stade de blastocyste. Dans ces conditions, la culture prolongée (CP) permet d'affiner cette sélection en faisant un tri entre les embryons évolutifs et non évolutifs. De plus, un transfert in utéro au stade blastocyste permet de maximiser les chances de grossesse en raison de la synchronisation de l'âge de l'embryon à celui de l'endomètre. C'est la raison pour laquelle, les taux de grossesse, d'implantation et de naissance sont significativement plus élevés après transfert à un stade tardif. La CP trouve donc toute sa place au sein des centres d'AMP pour développer le potentiel implantatoire des embryons J2-J3. Une revue de la littérature sur 25 études fournit aussi la preuve qu'il existe une différence significative entre les taux de natalité après transfert frais au stade blastocyste J5-J6 par rapport au stade clivé J2 (42% vs 32%). [20].

Dans ce contexte, Northrop, s'interroge sur les limites de la morphologie embryonnaire et sur le sort à réserver aux EMQ. [15, 25, 56].

Afin de minimiser la subjectivité liée à l'évaluation morphologique de la qualité embryonnaire, un consensus a été établi par un groupe d'experts au sein de l'ESHRE (Alpha, 2011) en définissant les critères des EMQ : embryons J2-J3 avec plus de 25% de fragmentation, présence de multinucléation et/ou une taille et un nombre de blastomères non en accord avec le jour d'observation [16]. Bien que des études aient montré un potentiel de développement et d'implantation pour certains EMQ la plupart d'entre eux sont, à ce jour, détruits ou destinés à la recherche fondamentale sur l'embryon. [47, 48,49, 57].

Kaartinen et al. (2014), obtient à partir d'EMQ laissés en culture prolongée des taux de grossesses cliniques et de naissances de 24,6% et 17,2% respectivement. Il prouve ainsi que l'utilisation de blastocystes surnuméraires augmente le taux d'accouchement cumulé (transfert frais et congelé) de 43% à 47%, et permet ainsi d'éviter l'initiation d'environ 53 cycles de FIV/ICSI supplémentaires. [50]. Les EMQ contribuent donc à augmenter le nombre de grossesses et de naissances.



Comme le démontre Shaw-Jackson et al. (2013) en rapportant que 16 % des EMQ peuvent former des blastocystes de haute qualité et aboutir ainsi à des taux d'implantation et de grossesse de 39% et 44% respectivement. [49].

Quant à Goto et al (2011), il recommande de mettre en CP toute la cohorte embryonnaire quelque soit leur niveau de qualité. En adoptant cette stratégie, il rapporte des taux de naissance de l'ordre de 44,8%. [58]. D'autres auteurs démontrent même que les EMQ transférés à J2 pourraient être intégrés dans des programmes de don d'ovocyte ou encore chez des jeunes patientes de bons pronostic. [59].

Ces différentes observations mettent en lumière les limites de l'évaluation morphologique de la qualité embryonnaire, qui est de plus en plus controversée depuis l'arrivée de nouveaux outils tentant d'améliorer la sélection embryonnaire. [60].

### 1. Le Time lapse

Le système "time lapse" est une caméra qui va permettre de photographier à intervalle régulier les embryons tout au long de leur développement durant leur culture au laboratoire. C'est un véritable "film" du développement embryonnaire qui est réalisé.

A la base développée pour la recherche, cette technologie présente différents intérêts en pratique courante de la prise en charge en AMP, que nous pouvons distinguer en deux catégories.

L'intérêt en terme de choix des embryons au moment du transfert. La réalisation de ce film du développement embryonnaire permet d'avoir un panorama complet de l'embryon, et de pouvoir véritablement comparer les embryons entre eux de façon plus objective (en particulier en terme de vitesse de développement). En pratique courante les embryons sont observés entre 3 et 6 fois et à des moments fixes (fécondation, 1er clivage, J2, J3, J5).

Les informations sont donc limitées voire absentes sur ce qui se passe en dehors de ces phases d'observation. De plus les études réalisées à l'aide du système time lapse ont permis de collecter des informations sur l'évolution des embryons et mis en évidence de nouveaux critères de sélection des embryons. [61].

L'autre intérêt réside dans les conditions de culture. L'objectif de la culture embryonnaire in vitro est de reconstituer au mieux les conditions in vivo en particulier en terme de température



et d'hypoxie (taux d'oxygène limité). Au-delà des caractéristiques techniques des différents incubateurs, le fonctionnement est basé sur le principe d'une ouverture-fermeture manuelle pour avoir accès aux boîtes de culture. Ainsi pour pouvoir suivre l'évolution des embryons dans l'optique d'un transfert *in utero*, ce n'est pas moins de 6 ouvertures de portes minimum. [61].

Le principe du *time lapse* est donc de pouvoir suivre l'évolution des embryons à la fois de façon plus précise, mais également de façon non délétère en maintenant des conditions strictement constantes tout le long de la culture.

La sécurité et l'innocuité de cette nouvelle technique que ce soit en termes de fécondation, de taux de clivage et de morphologie embryonnaire ont été validées. [62]. De même Selleskog montre que *le time-lapse* ne présente pas de retentissement sur le nombre d'embryons obtenus de bonne qualité par rapport à la culture conventionnelle. [60].

L'objectif principal de cette technique est de tenter d'identifier précocement les embryons à fort potentiel de développement sans pour cela devoir réaliser une culture prolongée. En effet, la culture longue des embryons a été décriée par un certains nombre d'auteurs en raison de son risque épigénétique potentiel et prônant la culture courte et la sélection précoce des embryons à transférer ou congeler. [63].

Cette volonté de sélection précoce des embryons passe par une série de mesures de temps de divisions cellulaires et d'états entre deux divisions aboutissant ainsi à l'élaboration d'un algorithme permettant d'établir le profil de l'embryon optimal.

En pratique, aucun auteur n'y est parvenu à ce jour. Toutefois, certaines équipes ont rapporté des résultats intéressants et encourageants. Wong et al. (2010) restituent un modèle prédictif de l'obtention des blastocystes à l'aide des critères cinétiques précoces : durée de la cytokinèse, temps entre la première et la deuxième division cellulaire et apparition synchrone des troisième et quatrième blastomères. [64].

De même Meseguer et al. (2011), établissent un algorithme prédictif du potentiel implantatoire des embryons. D'autres investigations, confirment l'arbre décisionnel de Meseguer pour la sélection des embryons ayant un fort potentiel de développement jusqu'au stade blastocyste [64, 65, 66, 67] et un fort potentiel d'implantation. [69].

Toutefois le time lapse présente certaines limites qui méritent d'être soulignées. Dans la littérature, aucune étude n'a démontré une amélioration significative des conditions de culture issues du time lapse par rapport à une incubation standard. De plus, les embryons étant placés dans des incubateurs individuels d'espace restreint, il n'est pas toujours aisé de mobiliser, de rouler ou de faire tourner sur eux mêmes les embryons pour les évaluer morphologiquement, et ce notamment en cas de fragmentation élevée et au stade blastocyste.

L'observation est réduite à un plan unique sur 7 coupes focales. L'algorithme sélectionnant les meilleurs embryons n'a pas, à ce jour, été mis au point. Mais l'un des principaux obstacles à l'utilisation du time lapse en routine est le manque d'études randomisées sur le développement embryonnaire, et l'état de santé des enfants nées dans le cadre d'une procédure *time-lapse* par rapport aux incubateurs standards. D'autant plus que son utilisation n'est pas prédictive des taux de grossesses. [60, 69].

Enfin, l'investissement dans la technologie du *time-lapse* représente un fort coût financier ne permettant pas à la majorité des centres d'AMP de s'équiper ce type de matériel.

## 2. L'ère de « l'OMICS »

Pour pallier aux limites des approches morphologiques et morphocinétiques, des nouvelles techniques non invasives dites « OMICS » ont émergé. Elles ont pour objectif de prédire la qualité embryonnaire et le taux de grossesse en analysant l'expression de biomarqueurs dans le milieu de culture embryonnaire. En effet, le micro-environnement de l'ovocyte et de l'embryon procure de nombreux biomarqueurs non invasifs influençant la qualité ovocytaire, et en conséquence la qualité embryonnaire. Des analyses métaboliques et protéomiques du milieu embryonnaire visent à sélectionner les embryons à fort potentiel d'implantation en fonction de leurs secrétomes. Du fait des techniques utilisées très sensibles de spectrométrie, chromatographie, résonance magnétique nucléaire et microarrays, seules de petites quantités infimes peuvent être analysées.

Elles réduisent l'écart de connaissances entre le génotype et le phénotype constituant ainsi des nouveaux défis pour les micro-biologistes informatiques. [60].



On distingue:

- La protéomique: analyse par spectrométrie de masse le profil protéique de la culture embryonnaire et ce au divers stades précoces du développement de l'embryon. Des études ont ainsi défini des protéines prédictives de la capacité de développement jusqu'au stade blastocyste et d'implantation. [60, 70].
- Le métabolisme: consiste à calculer un « score de viabilité » de l'embryon à partir de son profil métabolomique élaboré par spectrométrie. Il analyse ainsi le « turn over » des acides aminés de l'embryon pour évaluer sa capacité de développement, et d'implantation. [60,70].
- Le transcriptomique étudie le transcriptome soit l'ensemble des ARNm messagers produits lors du processus de transcriptions du génome embryonnaire par microarray. Cette approche identifie des gènes dont le niveau d'expression est corrélé au niveau d'implantation à la poursuite de la gestation et au développement placentaire. [60, 70].

L'OMICS présente aussi des limites. En effet, l'identification du microenvironnement embryonnaire révèle une quantité d'informations colossales et diverses qui nécessitent d'être triées intégrées à grande échelle pour l'élaborer de systèmes prédictifs adéquats.

L'intégration et l'analyse de l'ensemble des données recueillies nécessitent le développement des ressources de récupération, de modélisation mathématique et statistique, d'outils bio-informatiques puissants et onéreux, qui ne sont pas forcément accessibles à tous les biologistes et informaticiens.

A l'heure actuelle, elles nécessitent une validation par l'élaboration d'études prospectives sur de grands échantillons. [60, 70].

## Conclusion

L'évaluation morphologique de la qualité embryonnaire reste un outil solide et facilement accessible dans la sélection du meilleur embryon à transférer, ceci, malgré la controverse qu'elle suscite depuis les débuts de la FIV humaine.

La corrélation établie entre la morphologie et le potentiel évolutif de l'embryon conduit habituellement la majorité des laboratoires d'AMP à écarter les EMQ de la culture pour être détruits. Or, la proportion non négligeable de naissances obtenues à partir d'EMQ confirme les limites de la morphologie à identifier de manière certaine les embryons à fort potentiel de développement. Dans ces conditions, la culture prolongée représente un moyen de sélection supplémentaire en permettant la conservation de blastocystes augmentant ainsi significativement les chances de grossesse et de naissance.

Toutefois, les réserves émises autour de cette stratégie sur le plan épigénétique ont conduit de nombreuses équipes à réfléchir sur de nouveaux marqueurs de qualité embryonnaire. Ainsi, des technologies telles que le time lapse ou l'Omic, moins accessibles en routine, mais aux résultats encourageants et prometteurs, permettent d'envisager une nouvelle approche de la qualité embryonnaire. Il est clair qu'à l'avenir, l'évaluation de la qualité embryonnaire résidera dans l'association de plusieurs paramètres, morphologiques, fonctionnels, et métaboliques nécessitant une évaluation dans le cadre d'études prospectives sur de plus grandes cohortes. Ces approches permettront probablement de « sauver » de la destruction des embryons potentiellement pourvoyeurs de naissances.

## Références bibliographiques

- 1) Dauzier L, Thibault C, Wintenbergh. La fécondation in vitro de l'oeuf à la lapine. Les Comptes Rendus de l'Académie des Sciences 1954, Paris 238: 844-45.
- 2) Edward RG, Steptoe PC, Purdy JM (1980). Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *British Journal of Obstetric Gynaecology* 87: 737-56.
- 3) Agence de la biomedicine, 2012. Rapport annuel médical et scientifique de l'activité d'Aide Médicale à la Procréation 2011.
- 4) Jean Claude Empeire, *Pratique de la stimulation ovulatoire par les gonadotropins*, France: Springer, 2013, 174P.
- 5) Chian RC, Lim JH. Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. *In vitro of immature human oocytes for clinical application: past, today and tomorrow*. France: Spinger, 2011, 461-71P.
- 6) Cooper T, Noonan E, Von Eckardstein S, Auber J, Baker G, Behre H, Trine B, Haugen, Kurger T, Wang C, Mbizvo T, Vogelsong K. World Health Organization reference values for human semen. *Human Reproduction*. Volume 16, Issue 16, November 2010, Pages 231-245.
- 7) Herbemont C, Sifer C. Comment choisir le spermatozoïde en ICSI. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. Volume 42, Issue 11, Novembre 2014, Pages 800-805.
- 8) Guerin JF. Techniques de préparation du sperme en assistance médicale de la procréation (AMP): Explorations fonctionnelles des spermatozoïdes. *Revue Française des laboratoires*. Volume 1995, Issue 278, Octobre 1995, Pages 39-45.
- 9) Mandelbaum J. Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. *Histoire de la fécondation in vitro*. France: Spinger, 2011, 63P.
- 10) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Agence de la Biomédecine, 2011. Les troubles de la fertilité. Etats des connaissances et pistes pour la recherche.
- 11) Joris H. Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. *L'ISCI d'hier à aujourd'hui*. France: Spinger, 2011, 449P.



- 12) Boyer P, Mercier G, Boyer M. Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. *Morphologie de l'embryon humain: évaluation et corrélation à son potentiel de développement*. France: Spinger, 2011, 491-505P.
- 13) Boyer P, Boyer M. Evaluation non invasive de l'embryon: morphologie embryonnaire pré-implantatoire. Quatorzièmes Journées nationales de la FFER (Clermont-Ferrand, 18-20 novembre 2009). *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. Volume 37, Issues 11–12, November–December 2009, Pages 908–916.
- 14) Fleming TP, Sheth B, Fesenko I (2001). Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in the trophoctoderme differentiation and blastocyst morphogenesis. *Front Biosciences* 1: D1000-7.
- 15) Kovavic B, Vlajsavljevic V, Reljic M, Cizek-Sajko M. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocyste. *Reproduction Biomedicine Online*. Volume 8, 2004, Pages 687-689.
- 16) European Society of Human Reproduction and Embryology 2011a. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: processing of an expert meeting. *Human Reproduction*. Volume 26, 2011, Pages 1270-1283.
- 17) European Society of Human Reproduction and Embryology, 2011b. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: processing of an expert meeting. *Reproduction Biomedicine Online*. Volume 22, 2011, Pages 632-646.
- 18) Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, Devroey P. In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *The New England Journal of Medicine*. Volume 354, 2006, Pages 1139-1146.
- 19) Zech NH, Lejeune B, Puissant L, Vanderzwalmen S, Zech H, Vanderzwalmen P. Prospective evaluation of the optimal time for selecting a single embryo for transfer: day 3 versus day 5. *Fertility and Sterility*. Volume 88, 2007, Pages 244-246.
- 20) Glujovsky D, Blake D, Farquhar C. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database of systematic reviews*. Volume 7, 2012, p. CD002118.





- 21) European Society of Human Reproduction and Embryology. Single embryo transfer reduces the risk of perinatal mortality in IVF. [On ligne]. <http://www.eshre.eu/Press20Room/Press%20releases/Press%20releases%20ESHRE%202012/SET%20and%20perinatal%20mortality> (Page consultée le 24 avril 2015).
- 22) Béraud E, Brugnon F, Gremeau AS, Dejou L, Pons H, Janny L, Boyer C, Pouly JL. Réduction des grossesses multiples en AMP par un usage large du SET (Single Embryo Transfer) sur la période 2001–2010. *Gynécologie obstétrique & fertilité*. Volume 41, Issue 1, Janvier 2013, Pages 20-26.
- 23) Guérif F. Pour le transfert d'un seul embryon au stade blastocyste. *Gynécologie obstétrique & fertilité*. Volume 38, Issue 5, Mai 2010, Pages 358-360.
- 24) Leniaud L, Poncelet C, Porcher B, Martin-Pont B, Cédrin-Durnerin I, Hugues JN, Wolf JP, Sifer C. Évaluation prospective du transfert sélectif d'un embryon: deux années d'expérience. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. Volume 36, Issue 2, Février 2008, Pages 159–165.
- 25) Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens T, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in-vitro fertilization. *Human Reproduction*. Volume 13, 1998, Pages 3434–3440.
- 26) Santos MA, Teklenburg G, Macklon NS, Van Opstak D, Schuring-Blom GH, Krijtenburg PJ. The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of day 4, 5 and 8 human embryos. *Human Reproduction*. Volume 25, Issue 8, 2010, Pages 1916–1926.
- 27) Agence de la biomédecine 2013. Listes des procédés biologiques régulièrement utilisés en AMP et des techniques visant à améliorer les procédés biologiques autorisés.
- 28) Sifer C, Levy R. Contre le transfert systématique d'un seul embryon au stade blastocyste. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. Volume 38, Issue 5, Mai 2010, Pages 361–363.
- 29) Abdehafez FF, Desai N, Abou-Setta N, Falcone T, Godlfard J. Slow freezing-Vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: A systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biomedecine Online*. Volume 20, Issue 2, February 2010, Pages 209-222.



- 30) Brugnon F, Janny L. Qu'attendons-nous en France pour pratiquer la vitrification embryonnaire ? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. Volume 38, Issue 10, octobre 2010, Pages 641–642.
- 31) Hesters L, Achour-Frydman N, Mandelbaum J, Levy R. Vitrification embryonnaire: état des pratiques en France par les BLEFCO. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. Volume 41, Issue 9, septembre 2013, Pages 554–557.
- 32) Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Human Reproduction*. Volume 36, Issue 2, 1999, Pages 1318-23.
- 33) Ménézo Y, Hazout A, Veiga A, Servy E.J, Cohen-Bacrie P, Chouteau J, Junca AM, Dumont M. *Physiologie pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*. Culture embryonnaire prolongée et éclosion assistée. France: Springer, 2011, 521-28P.
- 34) Scott L, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Human Reproduction*. Volume 13, Issue 1, 1998, Pages 1003-13.
- 35) Alter L, Boitrelle F, Sifer C. Comment sélectionner aujourd'hui le meilleur embryon à transférer? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. Volume 42, Issues 7-8, Juillet-Aout 2014, Pages 515-525.
- 36) Shoukir Y, Campana A, Farley T. Early cleavage of in vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Human Reproduction*. Volume 88, Issue 6, 1999, Pages 1531-6.
- 37) Lundin K, Bergh C, Hardarson. T. Early embryo cleavage is a strong, indicator, of embryo quality in human IVF. *Human Reproduction*. Volume 36, Issue 2, 2001, Pages 2652-7.
- 38) Hardarson T, Caisander G, Sjögren A, Hanson C, Hamberger L, Lundin K. A morphological and chromosomal study of blastocyst developing from morphologically suboptimal human pre-embryos compared with control blastocysts. *Human Reproduction*. Volume 18, 2003, Pages 399–407.



- 39) Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Human Reproduction*. Volume 18, 2003, Pages 1062–1069.
- 40) Royère D. Guérif F. Développement de l’embryon préimplantatoire : état actuel et perspectives en embryologie clinique. Trente-neuvième Journée de thématique de la SFEF (Paris, 22 mai 2008). *Gynécologie Obstétrique et fertilité*. Volume 36, Issue 11, Novembre 2008, Pages 1119-1125.
- 41) Gardner DK. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and Sterility*. Volume 73, Issue 6, 2000, Pages 1155-1558.
- 42) Hill MJ, Richter KS, Heitmann RJ, Graham JR, Tucker MJ, Decherney AH, Browne PE, Levens ED. Trophectoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers. *Fertility and Sterility*, Volume 99, 2013, Pages 1283–1289.
- 43) Honma H, Baba T, Sasaki M, Hashiba Y, Ohno H, Fukunaga T, Endo T, Saito T, Asada Y. Trophectoderm morphology significantly affects the rates of ongoing pregnancy and miscarriage in frozen-thawed single-blastocyst transfer cycle in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. Volume 98, 2012, Pages 361–367.
- 44) Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertility and Sterility*. Volume 76, 2001, Pages 1157–1167.
- 45) European Society of Human Reproduction and Embryology, 2011b. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: processing of an expert meeting. *Reproductive Biomedicine Online*. Volume 22, 2011, Pages 632-646.
- 46) Guérif F, Lemseffer M, Leger J, Bidault R, Cadoret V, Chavez C, Gasnier O, Sausseureau MH, Royere D. Does early morphology provide additional selection power to blastocyst selection for transfer? *Reproductive Biomedicine Online*. Volume 21, Issue 4, October 2010, Pages 510-519.
- 47) Poulain M, Hesters L, Sanglier T, De Bantel A, Franchin R, Frydman N, Grynberg M. Is it acceptable to destroy or include human embryos before day 5 in research programmes? *Reproductive BioMedicine Online*. Volume 28, Issue 4, April 2014, Pages 522-529.




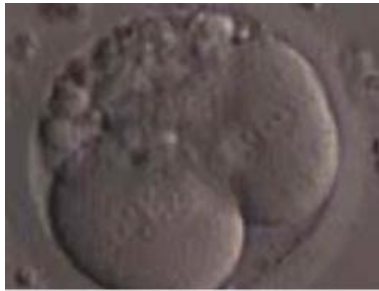
- 48) Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Human Reproduction*. Volume 15, 2000, Pages 2634–2643.
- 49) Shaw-Jackson C, Bertrand E, Becker B, Colin J, Beaudoin-Chabot C, Rozenberg S, Autin C. Vitrification of blastocysts derived from fair to poor quality cleavage stage embryos can produce high pregnancy rates after warming. *Journal of Assistance Reproduction and Genetic*. Volume 30, 2013, Pages 1035–1042.
- 50) Kaartinen N, Das P, Kananen K, Huhtala H, Tinkanen H. Can repeated IVF–ICSI-cycles be avoided by using blastocysts developing from poor-quality cleavage stage embryos? *Reproductive Biomedecine Online*. Volume 30, Issue 3, March 2015, Pages 241-247.
- 51) Guerif F, Lemseffer M, Bidault R, Gasnier O, Saussereau MH, Cadoret V. Single day 2 embryo versus blastocyst-stage transfer: a prospective study integrating fresh and frozen embryo transfers. *Human Reproduction*. Volume 24, Issue 5, May 2009, Pages 1051–1058.
- 52) Rienzi L, Ubaldi F, Lacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S. Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reproduction Biomedecine Online*, Volume 10, 2005, Pages 669–681.
- 53) Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen A.G, Gabrielsen A, Andersen A.N. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in vitro fertilization. *Human Reproduction*. Volume 12, 1997, Pages 1545–1549.
- 54) Fisch J, Rodriguez H, Ross R, Overby G, Sher G. The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. *Human Reproduction*, 2001, Pages 1970–1975.
- 55) Stecher A, Vanderzwalmen P, Zintz M, Wirleitner B, Schuff M, Spitzer D, Zech N. Transfer of blastocysts with deviant morphological and morphokinetic parameters at early stages of in-vitro development: a case series. *Reproductive Biomedecine Online*. Volume 28, Issue 4, April 2014, Pages 424-435.
- 56) Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*. Volume 26, 2011, Pages 1270–1283.

- 57) Northrop LE, Treff N.R, Levy B, Scott Jr RT, 2010. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy 529 demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Molecular Human Reproduction*. Volume 16, Issue5, April 2011, Pages 590–600.
- 58) Goto S, Kadowaki T, Tanaka S, Hashimoto H, Koikeguchi S, Shiotani M. Prediction of pregnancy rate by blastocyst morphological score and age, based on 1,488 single frozen–thawed blastocyst transfer cycles. *Fertility and Sterility*. Volume 95, Issue 3, March 2011, Pages 948–952.
- 59) Pelinck MJ, Hoek A, Simons A, Jheinevan MJ, Etchen-Arends J, Arts E. Embryos quality and impact of specific embryo characteristics on ongoing implantation in unselected embryos derived from modified cycle in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. Volume 94, Issue 2, July 2010, Pages 527-534.
- 60) Scalici E, Gala A, Ferrières A, Vincens C, Hamamah S. Does embryo morphology constitute a reliable criterion for embryo selection. *Gynécologie Obstétrique et fertilité*. Volume 42, Issue 9, September.
- 61) Fedour T, Lammers J, Slingart C, Jean M, Barriere P. L'observation en continu du développement embryonnaire en FIV (time-Lapse) à l'aide d'un embryoscope: un outil d'aide à la décision? *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*. Volume 40, Issue 9, Septembre 2012, Pages 476-480.
- 62) Cruz M, Gadea N, Garrido N, Pedersen KS, Martinez M, Pérez-Cano I, Munoz M, Meseguer M. Embryo quality blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *Journal of Assisted Reproduction and Genetic*. Volume 28, 2011, Pages 569-73.
- 63) Mio Y, Meada K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. Recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *American Journal of Obstetric and Gynecology*. Volume 199, Issue 6, 2008, Pages 660.
- 64) Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *National Biotechnology*. Volume 28, Issue 10, 2010, Pages 1115–1121.

- 65) Meseguer, J. Herrero J, Tejera A, Hilligsøe K.M, Ramsing N.B, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human Reproduction*, Volume 26, 2011, Pages 2658–2671.
- 66) Cruz M, Garrido N, Herrero J, Perez-Cano I, Munoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reproduction Biomedicine Online*. Volume 25, 2012, Pages 371-381.
- 67) Dal Canto M, Coticchio G, Mignini M, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, Comi R, Fradini R. Cleavage kinetic analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reproduction Biomedicine Online*. Volume 25, 2012, Pages 474-480.
- 68) Herrero J, Tejera A, Albert C, Vidal C, De laos Sants MJ, Meseguer M. A time to look back: analysis of morphokinetic characteristics of human embryo development. *Fertility and Sterility*. Volume 100, Pages 1602-1609.
- 69) Chamayou S, Patrizio P, Storaci G, Tomaselli V, Alecci C, Ragolia C. The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *Journal of Assistance Reproduction and Genetic*. Volume 30, 2013, Pages 703–710.
- 70) Royère D, Feuerstein P, cadoret V, uzbekova S, Dalbies-Tran R, Teusan R, Houlgatte R, Labas V, Guérif F. Non invasive assessment of embryo quality: Proteomics, metabolomics and oocyte-cumulus dialogue. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*. Volume 37, Issue 11-12, december 2009, Pages 917-920.



## Annexe 1: les stades de développement embryonnaire de bonne et mauvaise qualité

	Embryon de bonne qualité	Embryon présentant des anomalies de développement
<p><b>Stade de développement embryonnaire</b></p> <p><b>J0- Stade Zygote</b></p>	 <p>Zygote produit par ICSI avec des ON parfaitement alignés à la jonction des pronucléi. Cytoplasme et zone corticale claires. Classé Z1 selon Scott. <i>Selon l'atlas d'ESHRE 2012.</i></p>	 <p>Zygote produit d'ICSI et observé 18 heures post-insémination. Les pronucléi sont légèrement plus petits que la normale, les ON sont inégaux en nombre et en distribution. <i>Selon l'atlas d'ESHRE 2012.</i></p>
<p><b>J1-stade 2 cellules</b></p>	 <p>Embryon à 2 cellules: blastomères de taille égales à un noyau. <i>Selon l'atlas d'ESHRE 2012.</i></p>	 <p>Embryon à 2 cellules: blastomères binucléés et 25 à 30 % de fragmentation. <i>Selon l'atlas d'ESHRE 2012.</i></p>



**J2-stade clivé 4  
cellules**



Embryon à 4 cellules : blastomères de taille égales à un noyau. *Selon l'atlas d'ESHRE 2012.*



Embryon à 4 cellules: blastomères de taille égales sans noyaux visibles et 10-20% de fragmentation. *Selon l'atlas d'ESHRE 2012.*

**J3-stade clivé 8  
cellules**



Embryon à 8 cellules: blastomères de taille égales, et absence de fragmentation. *Selon l'atlas d'ESHRE 2012.*



Embryon à 8 cellules: blastomères de différentes tailles. *Selon l'atlas d'ESHRE 2012.*





**Compaction  
initiale**



Embryon à 8 cellules montrant les signes d'une compaction initiale. *Selon l'atlas d'ESHRE 2012.*



Embryon avec plus de 12 blastomères ne montrant aucun signe de compaction. Il est inhabituel à ce stade de voir une absence de compaction. *Selon l'atlas d'ESHRE 2012.*

**Stade Morula**



Morula de bonne qualité. Tous les blastomères ont été inclus dans le processus de compaction. *Selon l'atlas d'ESHRE 2012.*



Morula de mauvaise qualité. Les frontières cellulaires sont toujours visibles et une cellule n'est pas complètement incorporée dans la compaction. *Selon l'atlas d'ESHRE 2012.*



**J5-stade  
blastocyste**



Blastocyste : ICM compact, TE formant un épithélium cohésif. Catégorie 3:1:1. Selon l'atlas d'ESHRE 2012.

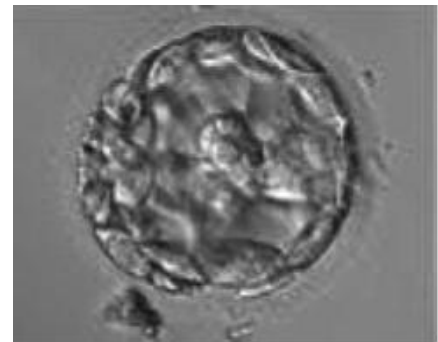


Blastocyste sans ICM clairement identifiable et comportant des cellules du TE trop grandes par rapport au stade embryonnaire. Catégorie 3:3:2. Selon l'atlas d'ESHRE 2012.

**J5-stade  
blastocyste**



Blastocyste avec une cavité occupant presque 50 % du volume de l'embryon. Selon l'atlas d'ESHRE 2012.



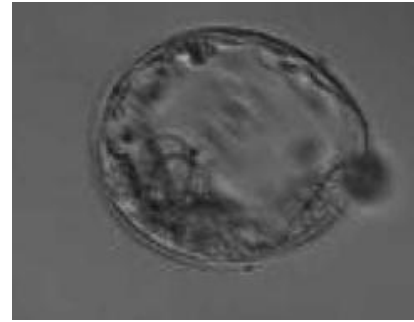
Blastocyste avec la cavité occupant 50 % du volume de l'embryon. Le volume global du blastocyste reste inchangé. Présence de débris cellulaires ne participant pas à la formation blastocyste. Selon l'atlas d'ESHRE 2012.



**J5-stade  
blastocyste**

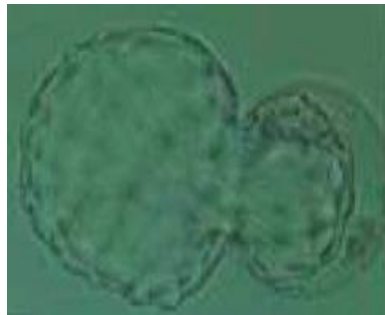


Blastocyste de bonne qualité avec un grand ICM en forme de champignon et un TE bien organisé. Catégorie 4:1:1. *Selon l'atlas d'ESHRE 2012.*

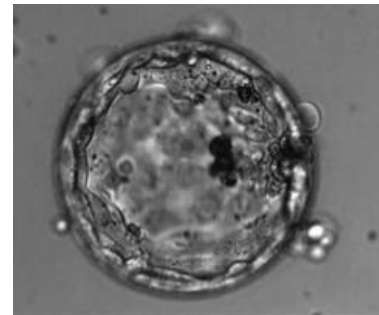


Blastocyste expansé avec un TE clairsemé qui ne forme pas d'épithélium cohésif. L'ICM se distingue à peine. Catégorie 4:3:3. *Selon l'atlas d'ESHRE 2012.*

**Ecllosion du  
blastocyste**



Ecllosion du blastocyste à 75%. ICM grand, compact et en forme de croissant. TE formant un épithélium cohésif. Catégorie 5:1:1. *Selon l'atlas d'ESHRE 2012.*



Blastocyste éclos. ICM non bien identifiable, TE composé de beaucoup de cellules formant un épithélium cohésif. Catégorie 4:3:1. *Selon l'atlas d'ESHRE 2012.*

**Figure 11:** Illustrations des différents stades de développement embryonnaire physiologiques et pathologique.