



**HAL**  
open science

# Impact du transfert différé d'embryons J2 sur le taux de grossesse en aide médicale à la procréation : étude de cohorte

Mathilde Bourdon

## ► To cite this version:

Mathilde Bourdon. Impact du transfert différé d'embryons J2 sur le taux de grossesse en aide médicale à la procréation : étude de cohorte. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01524419

**HAL Id: dumas-01524419**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01524419v1>**

Submitted on 18 May 2017

**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.

# AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. 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.

*Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4*

*Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10*

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES  
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2016

N° 111

THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE  
DOCTEUR EN MÉDECINE

Impact du transfert différé d'embryons J2 sur le taux de grossesse  
en aide médicale à la procréation : étude de cohorte

Présentée et soutenue publiquement  
le 3 octobre 2016

Par

***Mathilde BOURDON***

Née le 11 mai 1986 au Chesnay (78)

Dirigée par M. Le Docteur Pietro Santulli, MCU-PH

Jury :

M. Le Professeur Charles Chapron, PU-PH ..... Président

M. Le Professeur Jacques Lepercq, PU-PH

Mme Le Docteur Vanessa Gayet, PH



Except where otherwise noted, this work is licensed under  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

## Remerciements

Monsieur le Professeur Charles Chapron, vous me faites l'honneur de présider cette thèse, je vous remercie sincèrement. Je vous suis très reconnaissante d'avoir pu bénéficier de vos conseils, de votre rigueur, de votre dynamisme, et de votre efficacité certaine. Je vous remercie pour votre grande disponibilité ainsi que pour toute l'attention que vous pouvez me porter. Je suis honorée de pouvoir faire partie de votre équipe prochainement. Je vous remercie de la confiance que vous m'accordez et j'espère que je serai à la hauteur de vos attentes.

Monsieur le Professeur Jacques Lepercq, je suis heureuse de vous compter parmi les membres de mon jury. Je vous remercie sincèrement d'avoir eu la gentillesse d'accepter ma demande. Comme vous me l'avez dit, l'important est de choisir des membres du jury que l'on respecte et que l'on apprécie. Je suis admirative de votre professionnalisme, votre écoute et votre générosité envers les patientes et les étudiants, toujours dans la jovialité.

Madame le Docteur Vanessa Gayet, merci pour ta gentillesse et l'attention que tu as toujours su porter à mon égard. Merci pour toutes les connaissances que tu m'as apportées et m'apporteras encore j'espère. Sans toi, je ne serais pas arrivée jusque-là. Je suis ravie et honorée de pouvoir travailler avec toi par la suite et j'espère dans une ambiance toujours aussi agréable et douce. Je suis ravie que tu sois présente pour la dernière étape de ma vie d'interne en acceptant de participer au jury de cette thèse.

Monsieur le Dr Pietro Santulli, mon directeur de thèse, je te remercie de m'avoir guidée, encouragée, conseillée mais surtout de ta patience sans limite avec moi, ton soutien et ton enthousiasme par rapport à nos travaux communs. Je suis très heureuse de pouvoir travailler avec toi à l'avenir et je crois sincèrement que cela durera encore longtemps. Je te remercie pour tout ce que tu as déjà pu me transmettre et pour ce que tu me transmettras encore. Merci de m'avoir portée jusque-là !

## **Merci également...**

A tous les médecins, qui sont devenus pour certains des amis, que j'ai croisés au fil des semestres de l'internat, qui ont su me transmettre un peu de leurs connaissances, expérience et qui me permettront j'espère d'être un bon médecin.

A Julia et Valérie qui sont toutes les deux aussi intelligentes que drôles et qui m'ont tout de suite prises sous leur aile à Port Royal. Je vous remercie sincèrement pour votre bienveillance.

A Geneviève qui m'a donné le goût de la recherche et qui m'a accompagnée pendant mon année de Master 2.

A la 'Team' des sages femmes d'obstétrique à Port Royal, toujours motivées pour bosser mais aussi pour aller prendre un verre après la journée de boulot !

A toutes les infirmières, aides soignantes, secrétaires et toutes les personnes que j'ai pu croiser et qui m'ont aidée et facilitée la vie. Merci pour votre gentillesse et votre accueil.

A mes chers Co internes gynécologues, Cécile, Fleur, Alice, Emilie, Marie-Emmanuelle, Mathilde, Laura, Perrine, Claire, Mireille, Thomas et Valentin ; et anesthésistes, Frank et Nabil, qui m'ont permis de rire, de travailler dans une ambiance agréable et qui m'ont permis de souffler dans les moments plus difficiles.

A Lucie, Aymeric, Kerem et Damien, avec qui j'ai passé l'internat mais surtout des moments inoubliables à Paris, à New-York ou au Laos. Les études passent très vite quand on a la chance d'être entouré d'amis extraordinaires comme vous.

A tous mes amis du Vez... Audrey et Camille surtout, pour votre écoute sans relâche et votre amitié infinie.

A Claire, Adèle et Alexandra. Depuis la première année jusqu'à aujourd'hui notre amitié est intacte. Merci d'avoir toujours été aussi présentes dans les moments difficiles comme dans les moments de joie.

A mes parents, mon frère, ma sœur, pour avoir toujours cru en moi, de m'avoir toujours soutenue, écoutée et aussi pour vos relectures ! Merci de m'avoir accompagnée pendant toutes ces longues années de médecine. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre amour et pour tous les moyens déployés pour m'offrir ce qu'il y a de mieux.

A Antoine, pour ton optimisme, la stabilité que tu m'apportes dans ma vie et pour l'amour que tu me portes. Je te remercie pour le soutien que tu m'as apporté pour cette thèse mais surtout ton soutien dans tous mes projets futurs.

# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>2</b>
<b>PREAMBULE.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>7</b>
<b>1. IMPACT DE LA STIMULATION OVARIENNE CONTROLEE SUR L'IMPLANTATION .....</b>	<b>7</b>
1.1 RAPPEL SUR L'IMPLANTATION ET L'INFLUENCE HORMONALE .....	7
1.2 IMPACT DE LA SOC SUR LA RECEPTIVITE ENDOMETRIALE .....	8
1.3 MODIFICATION DU PROFIL D'EXPRESSION DES GENES DE L'ENDOMETRE PAR LA SOC .....	8
1.4 MODIFICATIONS IMMUNOLOGIQUES DE L'ENDOMETRE PAR LA SOC .....	9
1.5 IMPACT DE L'ELEVATION DE LA PROGESTERONE SUR L'ENDOMETRE .....	9
Figure I : Les stratégies de transfert d'embryon différé et de transfert d'embryon frais .....	11
<b>2. RESULTATS DU TRANSFERT D'EMBRYON DIFFERE EN CLINIQUE .....</b>	<b>12</b>
2.1 TAUX DE GROSSESSES EVOLUTIVES .....	12
A. En fonction de la réponse à la stimulation ovarienne .....	12
B. En cas de progestérone élevée le jour du déclenchement de l'ovulation.....	14
C. En cas d'échec de la première tentative de FIV/ICSI.....	14
D. En cas d'infertilité en lien avec de l'endométriose .....	14
E. En fonction du stade de développement de l'embryon transféré .....	15
2.2 TAUX DE FAUSSES COUCHES SPONTANEEES PRECOCES.....	16
2.3 TAUX DE GROSSESSES ECTOPIQUES.....	16
2.4 CONSEQUENCES OBSTETRIQUES ET NEONATALES .....	17
<b>3. PREVENTION DU RISQUE .....</b>	<b>20</b>
3.1 PREVENTION DU RISQUE DE SYNDROME D'HYPERSTIMULATION OVARIENNE (SHO) .....	20
3.2 PREVENTION DU RISQUE DE MALADIES THROMBOEMBOLIQUES .....	21
<b>OBJECTIF DE L'ETUDE .....</b>	<b>23</b>
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>24</b>
<b>1. DESIGN DE L'ETUDE .....</b>	<b>24</b>
<b>2. CONSTITUTION DE LA COHORTE ET PROCEDURE D'APPARIEMENT .....</b>	<b>25</b>
<b>3. LA STIMULATION OVARIENNE .....</b>	<b>26</b>
<b>4. FECONDATION DES OVOCYTES.....</b>	<b>27</b>
<b>5. CRYOPRESERVATION ET DECONGELATION DES EMBRYONS DANS LE GROUPE TED .....</b>	<b>28</b>
<b>6. LE TRANSFERT D'EMBRYON .....</b>	<b>30</b>
<b>7. ANALYSE DES DONNEES ET STATISTIQUES .....</b>	<b>31</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>33</b>
<b>1. POPULATION ETUDIEE.....</b>	<b>33</b>
Figure II : Diagramme de flux .....	34
Tableau I. Caractéristiques des patientes du groupe transfert frais (n=325) et du groupe transfert différé (n=325) .....	35
<b>2. CARACTERISTIQUES DE LA PROCEDURE DE FIV/ICSI .....</b>	<b>36</b>
Tableau II. Caractéristiques et résultats de la FIV/ICSI.....	37
<b>3. RESULTATS DE LA FIV/ICSI .....</b>	<b>38</b>

Tableau III : Facteurs indépendamment associés à l'obtention d'une grossesse évolutive : analyse multivariée par régression logistique .....	39
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>45</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>46</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>53</b>

## Préambule

La pratique du transfert d'embryon congelé a fortement augmenté depuis ces 10 dernières années dans le monde et cette tendance s'accélère [1]. Les rapports de la SART (society of Assisted Reproductive Technology) montrent qu'entre 2003 et 2013 le nombre de transferts d'embryons congelés autologues a plus que doublé [2]. Plusieurs raisons expliquent le succès grandissant de cette pratique. Le développement du « elective single embryo transfer », correspondant au transfert d'un seul embryon dans le but de prévenir le risque de grossesses multiples [3], ainsi que l'amélioration des techniques de cryoconservation, et notamment la vitrification [4] ont contribué à fortement augmenter le nombre d'embryons disponibles à la congélation. Ensuite, la tendance n'a plus été seulement de congeler uniquement les embryons surnuméraires mais de congeler l'ensemble de la cohorte embryonnaire obtenue afin de transférer les embryons de façon différée, sur un cycle ultérieur à la stimulation ovarienne contrôlée (SOC) : c'est la stratégie du transfert d'embryon différé (TED) (figure 1). Initialement, cette stratégie utilisée après un protocole de stimulation par antagonistes GnRH (de l'anglais *Gonadotropin Releasing Hormone*) et un déclenchement de l'ovulation par agoniste GnRH a été développée pour faire face au risque de syndrome d'hyperstimulation ovarienne (SHO) chez les patientes répondant fortement à la stimulation [5,6]. Puis, basée sur l'hypothèse que la SOC en fécondation *in vitro* (FIV) / Intra cytoplasmique sperm injection (ICSI) pourrait avoir un effet négatif sur la réceptivité endométriale, la stratégie du TED s'est répandue à d'autres situations cliniques afin de tenter d'améliorer les taux de grossesses.

Afin de mieux comprendre les enjeux, les bénéfices et les risques du transfert différé, nous ferons en introduction un état des lieux de cette pratique puis nous comparerons dans une large cohorte le taux de grossesse évolutive après transfert différé versus transfert frais, au stade J2 afin de préciser s'il existe dans cette population un potentiel effet de la stimulation ovarienne sur l'implantation.

# **Introduction**

## **1. Impact de la stimulation ovarienne contrôlée sur l'implantation**

### **1.1 Rappel sur l'implantation et l'influence hormonale**

L'implantation est une étape précoce de la grossesse se définissant par la mise en place de contacts cellulaires entre l'embryon et l'endomètre. La réussite de l'implantation repose sur la qualité de l'embryon, la réceptivité de l'utérus et la synchronisation des stades de développement entre l'embryon et l'endomètre [7]. L'endomètre est réceptif pendant une période limitée. Au-delà de celle-là, l'implantation embryonnaire ne peut avoir lieu. Cela correspond à la fenêtre d'implantation, entre J6 et J10 après l'ovulation [8].

Les stéroïdes (œstradiol (E2) et progestérone (P4)) ont un rôle essentiel dans la réceptivité utérine, l'implantation et le maintien de la grossesse. Ils entraînent des modifications structurelles et moléculaires de l'endomètre permettant à l'embryon de s'implanter. Avant l'ovulation, l'E2 a un effet prolifératif sur l'endomètre. L'E2 induit la synthèse des récepteurs à l'E2 et à la P4 dans les glandes endométriales et le stroma lors de la phase folliculaire. Ensuite, après l'ovulation et la formation du corps jaune, l'E2 va stimuler par le biais de la P4 ces glandes endométriales et l'endomètre va devenir « sécrétoire » jusqu'à devenir optimal pour la réception de l'embryon et l'implantation. On met en évidence la présence de vacuoles ainsi que des projections cytoplasmiques appelés 'pinopodes' à la surface de l'épithélium lors de la fenêtre d'implantation. La P4 joue un rôle essentiel pour la réceptivité de l'endomètre en induisant des modifications histologiques de l'endomètre indispensables pour l'implantation de l'embryon [9].

Lors de la SOC, les niveaux d'E2 et de P4 atteignent des taux dit 'supra-physiologiques' : Le taux d'E2 est à plus de 5 fois supérieur à celui observé lors d'un cycle naturel. Une élévation de la P4 peut être également associée. Une hypothèse avancée dans la littérature est que ces

taux supra-physiologiques d'hormones pourraient avoir un effet négatif sur l'implantation. En cas de TED, le transfert d'embryon ayant lieu à distance de la SOC (figure 1), l'effet négatif sur l'endomètre pourrait être réduit.

## **1.2 Impact de la SOC sur la réceptivité endométriale**

La stimulation ovarienne lors de la FIV/ICSI modifie la dynamique de maturation de l'endomètre [10–12]. Ce dernier pourrait atteindre plus précocement sa phase de réceptivité.

Les pinopodes formés au pôle apical de l'épithélium, visibles normalement lors de la fenêtre d'implantation, sont présents plus précocement, à partir de J4 après l'ovulation [10].

Après la SOC il est observé sur un grand nombre de biopsies de l'endomètre réalisées le jour de la ponction ovocytaire, une avance de maturation de l'endomètre de 2 à 4 jours [11,12]. Un

des marqueurs de la fenêtre d'implantation, le « nucleolar channel system » est retrouvé précocement au niveau de l'endomètre après une SOC par rapport à un cycle naturel [13].

L'analyse de sécrétions de l'endomètre prélevées juste avant le transfert d'embryon montre après la SOC, une augmentation significative de différents marqueurs (Interleukines, TNF $\alpha$ , HbEGF...) connus pour jouer un rôle dans l'implantation, par rapport à un cycle naturel [14].

L'embryon transféré après une SOC semble exposé à un environnement différent de celui rencontré lors d'un cycle naturel. La SOC pourrait être responsable dans certains cas d'une avance de maturation de l'endomètre et d'une asynchronie entre l'embryon et l'endomètre, engendrant une perturbation de l'implantation et du développement précoce de l'embryon.

## **1.3 Modification du profil d'expression des gènes de l'endomètre par la SOC**

Le profil d'expression des gènes s'exprimant au niveau de l'endomètre après l'ovulation est différent après une SOC comparé à un cycle naturel [15–19].

Lors de l'acquisition d'un endomètre réceptif, de nombreux gènes sont activés, que ce soit après un cycle naturel ou après une SOC [17,19]. Seulement 46% de ces gènes activés sont identiques dans les cycles naturels et stimulés [19]. Cela suggère que la SOC active des gènes

différents. Certains, impliqués dans l'implantation peuvent être activés lors d'un cycle naturel et réprimés après une SOC [19].

L'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'instauration du processus d'implantation semble perturbée par les taux élevés de stéroïdes lors de la SOC, notamment la voie canonique Wnt/ $\beta$ caténine qui pourrait avoir un rôle central dans la coordination des interactions entre l'endomètre et l'embryon [18,20].

Cependant, le retentissement fonctionnel de ces modifications d'expression génique sur l'implantation embryonnaire n'est pas clair aujourd'hui [15,21].

#### **1.4 Modifications immunologiques de l'endomètre par la SOC**

Des modifications immunologiques ont également été mises en évidence après la SOC.

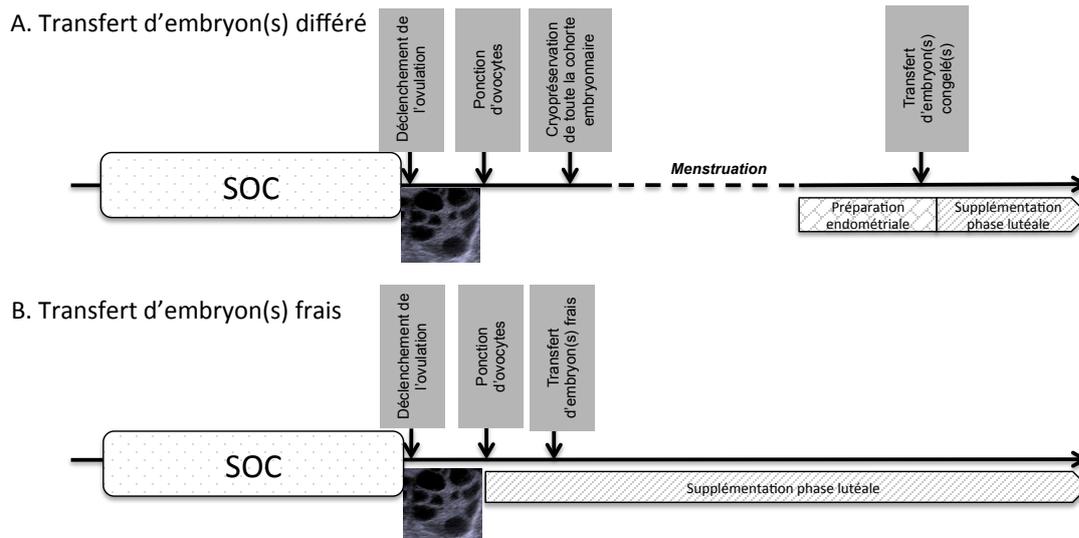
Lors d'un cycle spontané, des modifications immunologiques au niveau systémique et au sein de l'endomètre ont lieu sous l'influence des hormones stéroïdiennes, afin de préparer l'implantation [22]. Les cellules 'natural killers' (NK), les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes jouent un rôle majeur dans l'établissement et le maintien de la grossesse. Les cellules déciduales NK augmentent la production de cytokines, de facteurs de croissance et de facteurs angiogéniques comme le VEGF. Cela permet, entre autre, un remodelage des artères spiralées et la migration des cellules trophoblastiques [22]. Chez la souris, on retrouve une concentration de cellules NK au niveau de l'endomètre significativement plus faible après SOC en comparaison à un cycle naturel [23]. Chez l'Homme, une diminution de la concentration de cellules NK a également été mise en évidence après SOC, cependant le taux de VEGF reste similaire [24].

#### **1.5 Impact de l'élévation de la progestérone sur l'endomètre**

L'augmentation du taux de progestérone, proportionnelle à la réponse à la SOC [25] semble être en partie responsable des modifications de l'endomètre lors de la FIV/ICSI. Il a été démontré, sur une cohorte prospective de 106 cas, que la maturation de l'endomètre en cas de

progestérone élevée (> 1.7ng/ml le jour du déclenchement de l'ovulation) était plus précoce que lorsque le taux de progestérone était inférieur à 1.7ng/ml [26]. L'élévation de la progestérone induit également des modifications au niveau génomique : une analyse portant sur 12 biopsies d'endomètre issues de 12 donneuses d'ovocytes prélevées à J7 du déclenchement par hCG met en évidence 140 gènes dérégulés en cas de progestérone élevée (> 1.5ng/ml au moment du déclenchement) [27]. L'expression des micro ARN (ARN jouant un rôle dans la régulation de l'expression génique) et des ARN messagers est également modifiée dans l'endomètre à J6 post-ovulation en cas de progestérone élevée (>1.88ng/ml le jour du déclenchement) [28]. En clinique, l'élévation de la progestérone au cours de la FIV/ICSI est liée à une diminution du taux de grossesse [29,30].

La Stimulation Ovarienne Contrôlée induit des modifications histologiques, géniques et immunologiques au niveau de l'endomètre. Le retentissement fonctionnel de ces modifications sur le taux d'implantation et sur la probabilité d'obtention d'une grossesse est suggéré dans de nombreuses études mais non clairement démontré. Il semble que dans certains cas, la SOC engendre une avance de maturation de l'endomètre. Le transfert d'embryon différé sur un cycle suivant 'naturel' ou 'artificiel' permettrait de resynchroniser l'endomètre et l'embryon transféré.



**Figure I :** Les stratégies de transfert d'embryon différé et de transfert d'embryon frais

A. La stratégie du transfert d'embryon(s) différé (TED): Elle consiste en la cryoconservation de toute la cohorte embryonnaire suivi d'un transfert d'embryon congelé-décongelé sur un cycle ultérieur à distance de la SOC. Afin de transférer l'embryon sur un endomètre réceptif, une préparation de l'endomètre est réalisé selon divers protocoles de préparation endométriale décrits dans la littérature : (i) un cycle artificiel avec l'apport de progestérone et d'estrogène, (ii) un cycle stimulé par des gonadotrophines ou du citrate de clomifène ou (iii) un cycle naturel [31]. Après le transfert un soutien de la phase lutéale est proposé [32].

B. La stratégie de transfert d'embryon frais: le transfert a lieu dans les jours suivant la SOC en fonction du stade de(s) l'embryon(s) transféré(s). Après le transfert, un soutien de la phase lutéale est proposé [32].

SOC, Stimulation Ovarienne Contrôlée.

## 2. Résultats du transfert d'embryon différé en clinique

### 2.1 Taux de grossesses évolutives

Dans la littérature, plusieurs auteurs étudient le taux de grossesse en fonction du type de transfert d'embryon [33–40]. Roque et al. dans une méta-analyse incluant 3 études randomisées, montrent des résultats en faveur du TED. Ils concluent à une amélioration de la réceptivité endométriale [35]. Sur 633 cycles, ils montrent une augmentation significative du taux de grossesse évolutive après TED (RR : 1.32, 95%CI 1.10-1.59). Néanmoins, cette méta-analyse doit être interprétée avec précaution étant donné qu'une des études qui la constitue a été retirée de la littérature du fait de problèmes méthodologiques [38]. Cela rend la conclusion de cette méta-analyse incertaine.

Plusieurs publications étudient l'efficacité du transfert différé sur le taux de grossesses dans diverses situations cliniques :

#### *A. En fonction de la réponse à la stimulation ovarienne*

Shapiro et al. étudient une population répondant fortement à la stimulation (âge moyen <35 ans, taux moyen de FSH à J3 < 6.5UI/L, taux moyen de follicules antraux > 20, nombre moyen d'ovocytes ponctionnés >15) [34]. Entre les groupes, aucune différence significative concernant le taux de grossesses évolutives n'a été mise en évidence [34/52 (65.4%) dans le groupe transfert frais versus 38/49 (77.6%) dans le groupe transfert différé,  $p=0.1943$ ]. Cependant, il semble difficile d'extrapoler ces résultats en pratique courante : cette étude porte sur un échantillon de faible effectif (62 femmes dans le groupe transfert frais et 60 dans le groupe TED). Par ailleurs, dans cette étude randomisée, le calcul du taux de grossesse est rapporté au nombre de transferts de blastocystes et non au nombre de patientes randomisées dans chaque groupe.

Une autre étude de la même équipe porte sur une population de femmes répondant normalement à la stimulation (âge moyen < 33 ans, taux moyen de FSH à J3 < 7.2UI/L, taux

moyen de follicules antraux <13) [33]. Le taux de grossesses évolutives était significativement plus important après TED par rapport au transfert frais [39/50 (78%) vs. 27/53 (50,9%) respectivement,  $p=0.0072$ ]. Cependant, ces résultats doivent être considérés avec précaution. On ne peut exclure un manque de puissance dans cette étude : Les effectifs dans chaque groupe sont faibles (67 femmes dans le groupe transfert frais et 70 dans le groupe TED), le taux d'annulation est important (20.9% et 28.6% respectivement) et l'inclusion des patientes a été arrêtée prématurément alors que le nombre de sujets nécessaires à inclure n'était pas atteint. Enfin dans cette étude toutes les patientes randomisées ne sont pas prises en compte dans l'analyse. Le taux de grossesses obtenues est rapporté au nombre de transferts de blastocystes et non au nombre de patientes randomisées dans chaque groupe. En intention de traiter, les résultats sont différents : le taux de grossesse évolutive n'est plus significativement différent une fois ce taux rapporté au nombre de patientes randomisées dans chaque groupe [taux de grossesses évolutives : 27/67 (40.3%) vs. 39/70 (55.7%) respectivement,  $p=0.088$ ]. Ainsi les résultats de cette étude doivent être interprétés avec précaution.

Concernant les patientes définies comme 'mauvaises répondeuses', Cobo et al., dans une étude prospective non randomisée, étudient le succès de grossesse après transfert frais ou transfert différé, chez des femmes présentant un taux de FSH à J3 du cycle supérieur à 11UI/L, un compte de follicules antraux inférieur à 6 et pour lesquelles moins de 5 ovocytes étaient obtenus [41]. Dans le groupe transfert différé, les ovocytes étaient vitrifiés, puis les embryons transférés une fois un nombre suffisant d'embryons atteints après accumulation d'ovocytes sur plusieurs cycles de stimulation. Dans le groupe transfert frais, plusieurs cycles de stimulation étaient proposés. Le taux de naissance vivante obtenue par patiente n'était pas significativement différent entre les groupes. Ainsi cette technique de TED avec accumulation d'ovocytes ne semble pas améliorer le taux d'implantation ni le taux de naissance vivante en cas de mauvaise réponse à la stimulation [41].

### *B. En cas de progestérone élevée le jour du déclenchement de l'ovulation*

Une seule étude prospective porte sur la stratégie du TED et le taux de progestérone lors du déclenchement. Elle conclut que le taux de grossesse évolutive, après un TED, pour les patientes présentant un taux de progestérone  $> 1.5$  ng/ml, est significativement plus important qu'après un transfert frais, chez des patientes avec un taux de progestérone inférieur à 1.5ng/ml [42]. Cependant les groupes ne sont pas comparables : les patientes du groupe TED présentaient une meilleure réserve ovarienne et donc a priori un meilleur pronostic. De plus, le taux de progestérone plus important peut être le reflet d'une meilleure réponse à la stimulation ovarienne [29].

Cependant, dans une méta-analyse portant sur 55.199 cycles de transfert frais et 7.229 cycles de transfert d'embryons congelés, il est clairement démontré qu'un taux de progestérone élevé ( $\geq 0.8$ ng/ml) le jour du déclenchement réduit significativement la probabilité d'obtenir une grossesse après un transfert frais, contrairement au transfert d'embryons congelés [30]. Plus récemment, Healy et al. montrent qu'en cas de transfert frais ou congelé de blastocystes de bonne qualité, les chances de grossesses sont identiques tant que le taux de progestérone reste inférieur à 2ng/ml. Par contre, au dessus de ce seuil, les taux d'implantation et de grossesses sont réduits après un transfert frais [39].

### *C. En cas d'échec de la première tentative de FIV/ICSI*

Le TED a été étudié en cas d'échec de première tentative dans une étude prospective [37]. Il semble être prometteur en cas d'échec d'un premier transfert frais de blastocyste. Le taux cumulé de naissances vivantes était de 46.2% après TED versus 27.6% après transfert frais ( $p < 0.05$ ).

### *D. En cas d'infertilité en lien avec de l'endométriose*

Une seule étude rétrospective compare, chez les patientes endométriosiques, le transfert d'embryon frais au transfert d'embryons congelés. Elle montre un taux de naissances vivantes

équivalent quel que soit le mode de transfert [25/148 (16.9%) dans le groupe transfert congelé versus 52/267 (19.5%) dans le groupe transfert frais, NS] [43]. Cependant les auteurs montrent en cas de transfert d'embryons congelés, un taux de grossesses supérieur chez les patientes endométriosiques par rapport aux patientes sans endométriose (18.2% versus 12.7%,  $p=0.04$ ) et concluent que le transfert d'embryons congelés est une stratégie prometteuse en cas d'endométriose. L'hypothèse évoquée est que, chez les patientes atteintes d'endométriose, la réceptivité endométriale pourrait être perturbée après la SOC. Il a été montré que l'endomètre eutopique présente des modifications biochimiques et structurelles aggravées par certains stéroïdes. [44,45]. Ainsi, transférer l'embryon en différé pourrait restaurer une réceptivité optimale pour l'implantation et améliorer le taux de grossesse. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

#### *E. En fonction du stade de développement de l'embryon transféré*

La majorité des études publiées, décrivant des résultats en faveur du transfert différé, portent sur le transfert d'embryon au stade blastocyste (figure 1 supplémentaire) [33,34,36,37,40,46]. Cependant Shapiro et al. montrent que seulement après un transfert différé de blastocyste J6, le taux de grossesses est amélioré par rapport à un transfert de blastocyste frais (54.3% vs 17.1%, respectivement,  $p<0.001$ ) [36]. En cas de transfert de blastocystes à J5 ce taux de grossesses était comparable quel que soit le mode de transfert (60.9% en TED vs. 56.5% en frais, NS). Les auteurs concluent que le TED pourrait permettre de resynchroniser l'embryon et l'endomètre, la SOC engendrant une avance de maturation de l'endomètre et ainsi un défaut de réceptivité endométriale.

Ozgür et al. comparent, dans une étude rétrospective, le taux de grossesses cliniques après transfert frais versus transfert d'embryons congelés en fonction du stade de développement du blastocyste, selon la classification de Gardner [40]. Pour les blastocystes de grade 2-3 et 5 il n'existe pas de différence significative concernant le taux de grossesses évolutives. Après transfert de blastocystes de grade 4, le taux de grossesse clinique est significativement

supérieur après un transfert d'embryons congelés par rapport à un transfert frais ( $p < 0.001$ ). Il ne semble pas exister d'explications concernant ces différences en fonction du stade du blastocyste [40].

Les données de la littérature permettent difficilement de conclure si l'utilisation d'une stratégie de transfert différé potentialise les chances de grossesses pour toutes les patientes. Cependant, dans certaines situations non propices à une implantation, comme en cas de progestérone élevée au moment du déclenchement, le TED permet de 'sauver' le cycle en transférant les embryons à distance et optimiser les chances d'implantation.

## **2.2 Taux de fausses couches spontanées précoces**

Il ne semble pas exister dans la littérature une différence de taux de fausses couches spontanées précoces après un transfert d'embryon frais ou différé. Le taux de fausses couches spontanées précoces varie entre 9.5 et 34.2% selon les études [33,34,36,46,47].

## **2.3 Taux de grossesses ectopiques**

Le risque de grossesse ectopique est évalué dans la littérature en fonction du type de transfert frais ou congelé. Il est sujet à controverse : alors que certaines études retrouvent un risque accru de grossesses ectopiques après un transfert frais par rapport à un transfert d'embryon congelé [47–50] d'autres ne retrouvent pas de différences significatives [51,52]. Le taux de grossesses ectopiques semble être dépendant du nombre d'embryons transférés [52], du type d'infertilité, notamment de l'infertilité d'origine tubaire [52] et du stade de l'embryon transféré. Les embryons transférés au stade blastocyste semblent moins pourvoyeurs de grossesses ectopiques que le transfert d'embryons au stade J2-J3 [48,49,51,52]. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer un lien entre le risque de grossesses ectopiques et les stratégies de prise en charge en assistance médicale à la procréation (AMP).

## 2.4 Conséquences obstétricales et néonatales

Les études publiées ce jour concernant les conséquences obstétricales et néonatales comparent le transfert frais au transfert d'embryon congelé, que ce soit dans le cadre de la stratégie du transfert différé (TED) qui consiste en la cryoconservation de toute la cohorte embryonnaire suivi d'un transfert d'embryon en différé sur un cycle ultérieur, à distance de la SOC ou du transfert des embryons surnuméraires congelés après une première tentative de transfert frais. Ces embryons surnuméraires sont transférés dans un second temps si le transfert d'embryon frais n'a pas abouti à une grossesse.

Les données de la littérature concernant spécifiquement les issues obstétricales et néonatales après TED sont quasiment inexistantes étant donné le caractère relativement nouveau de cette stratégie [53].

Des études récentes montrent que le transfert d'embryon congelé permettrait d'améliorer le devenir obstétrical après une prise en charge en AMP. Une méta-analyse publiée en 2012 [54] concluait que les grossesses uniques issues d'un transfert d'embryon congelé étaient moins à risque d'accouchements prématurés (<37 semaines d'aménorrhées), (OR 0.84 IC95% 0.78-0.90), de fœtus petits pour l'âge gestationnel (PAG, poids de naissance < 2DS) (OR 0.45 IC95% 0.30-0.66), de petits poids de naissance (<2500g) (OR 0.69 IC95% 0.62-0.76), d'hémorragie du 2<sup>o</sup> et 3<sup>o</sup> trimestres (OR 0.67 IC95% 0.55-0.81) et de mortalité périnatale (OR 0.68 IC95% 0.48-0.96) qu'après un transfert d'embryon frais.

En 2013, une large étude observationnelle portant sur 42.242 grossesses issues de transferts frais et 6.647 grossesses issues de transfert d'embryon congelés [55] montrait des résultats similaires. Les risques d'accouchements prématurés et d'accouchements très prématurés (<32SA), les risques de PAG et de petits poids de naissance étaient également diminués lors de grossesses uniques obtenues après un transfert d'embryon congelé comparés à ceux après un transfert d'embryon frais. D'autres études observationnelles retrouvent des résultats

similaires : Après un transfert d'embryon congelé, les risques de petit poids de naissance [56,57], de PAG [56] et d'accouchement prématuré [56] étaient diminués.

Cependant, il existe dans la littérature des résultats divergents tempérant les effets bénéfiques du transfert d'embryon congelé. Bien que les risques d'accouchement prématuré, de petit poids de naissance et de PAG soient significativement diminués par rapport à un transfert frais, Wennerholm et al. retrouvaient à l'inverse un taux de mortalité périnatale supérieure après transfert d'embryons congelés (OR 1.49 IC95% 1.07-2.07) [55]. Plus récemment une large étude observationnelle menée en Amérique latine ne montrait pas de différence en termes de mortalité périnatale (OR 1.72 IC95% 0.81-3.62) ou encore d'accouchement prématuré (<37SA) (OR 1.05 IC95% 0.93-1.18) après grossesses issues de transferts d'embryons frais ou congelés [58].

Certaines complications obstétricales semblent liées spécifiquement aux grossesses issues de transfert d'embryons congelés : Wennerholm et al. concluaient que les risques d'accouchement post terme (OR 1.40, IC95% 1.27-1.55), de gros pour l'âge gestationnel (GAG, poids de naissance >2DS) (OR 1.45 IC95% 1.27-1.55), et de macrosomie (>4500g) (OR 1.58 IC95% 1.39-1.80) étaient plus importants lors des grossesses singletons après transfert d'embryon congelé en comparaison au transfert frais. Ce risque significativement plus important de GAG [59,56,47] et de macrosomie [59] a également été montré par d'autres équipes.

Enfin, certaines complications obstétricales sont critiquées dans la littérature comme le risque de placenta accreta [56,60] ou le risque d'HTA gravidique [56,61] qui semblent plus fréquents après transfert d'embryon congelé en comparaison au transfert frais.

Une grande hétérogénéité existe entre toutes ces études notamment concernant les caractéristiques de la population étudiée, les milieux de cultures utilisés, les méthodes de congélation et décongélation des embryons, le stade de l'embryon transféré ainsi que la préparation de l'endomètre avant le transfert. Cela rend difficile l'interprétation des résultats.

Par ailleurs, bien que le transfert d'embryon congelé semble parfois améliorer les issues obstétricales et néonatales par rapport au transfert d'embryon frais, le taux de complications reste majoré par rapport aux grossesses spontanées. Les risques de GAG (1.41, IC95% 1.01-1.98) et de macrosomie (1.67, IC95%1.18-2.37) semblent également augmentés en cas de transfert d'embryon congelé par rapport à une grossesse obtenue par conception spontanée [59].

Les facteurs causant ces variations de poids de naissance ainsi que les autres complications périnatales sont encore inconnus bien qu'il semble exister une corrélation entre certaines complications obstétricales et la réponse à la stimulation ovarienne ou le taux d'hormones stéroïdiennes en début de grossesse [62,63].

L'absence de stimulation ovarienne et/ou la congélation embryonnaire en cas de transfert d'embryon congelé sont probablement intriquées dans ces modifications obstétricales et néonatales. Cela pourrait induire l'activation ou l'inactivation de voies de signalisation sur le plan métabolique ou endocrinien ainsi que des modifications d'ordres épigénétiques [64]. A ce jour il est difficile de savoir si ces potentielles modifications épigénétiques pourraient avoir un retentissement à long terme, chez ces enfants, nés de transfert d'embryon congelé. Une seule équipe a analysé l'état de santé des enfants issus de grossesses obtenues après transfert d'embryon congelé ou transfert frais à l'âge de 3 ans. Il n'y semble pas avoir de différences [65].

### **3. Prévention du risque**

Les risques liés aux traitements d'AMP sont multiples [66]. Prévenir au maximum ces risques est indispensable afin d'assurer à ces patientes non malades mais infertiles la meilleure prise en charge possible. Le TED pourrait permettre de limiter l'apparition de certaines de ces complications notamment le risque de syndrome d'hyperstimulation ovarienne et le risque de survenue de maladies thromboemboliques.

#### **3.1 Prévention du risque de syndrome d'hyperstimulation ovarienne (SHO)**

Le syndrome d'hyperstimulation ovarienne (SHO) est une complication iatrogène de l'AMP pouvant dans de rares cas conduire au décès [67]. Le SHO est secondaire à une réaction excessive à la stimulation par les gonadotrophines. Cette hyperstimulation ovarienne entraîne une augmentation de la perméabilité capillaire et une fuite de liquide du secteur vasculaire vers un troisième secteur créant des épanchements des séreuses et une hémococoncentration. On distingue deux types de SHO selon le délai d'apparition : (i) le SHO précoce survient trois à sept jours suivant le déclenchement de l'ovulation. Il est provoqué par l'injection d'hCG (de l'anglais *human chorionic gonadotropin*) exogène déclenchant l'ovulation ; (ii) Le SHO tardif apparaît une dizaine de jours après le transfert embryonnaire. Il est provoqué par la sécrétion endogène d'hCG en cas de grossesse [67,68]. L'incidence du SHO est estimée selon les études entre 3 et 6 % dans les formes modérées et 0.1-2% pour les formes sévères [68].

La prévention du risque de SHO et son diagnostic précoce sont indispensables pour garantir la sécurité des patientes. Une étape primordiale est le dépistage des facteurs de risques permettant d'adapter la prise en charge pour les patientes les plus à risques [67]. Certains facteurs de risques sont identifiables avant la SOC comme la femme jeune, le syndrome des ovaires polykystiques, ou la notion d'un antécédent de SHO [68]. Lors de la SOC, la réponse rapide et forte à la stimulation constitue un facteur de risque important [68]. Si le risque de SHO est imminent, la stratégie semblant la plus efficace pour éviter cette

complication, tout en assurant un taux de grossesses satisfaisant, est l'utilisation d'un protocole antagoniste suivi d'un déclenchement de l'ovulation par un agoniste GnRH (aGnRH) et un transfert d'embryon différé [5,6,69].

L'hCG exogène déclenchant l'ovulation joue un rôle majeur dans l'apparition du SHO et l'hCG endogène secrété par le trophoblaste en cas de grossesse l'aggrave fortement. Ainsi le déclenchement de l'ovulation par un aGnRH permet d'éviter le SHO précoce. Cela induit une réduction de la stéroïdogénèse et une luteolyse précoce empêchant la sécrétion de substances vasoactives responsable de SHO.

Cependant, après un déclenchement par aGnRH associé à un transfert d'embryon frais, le taux de grossesses semble moins important qu'après déclenchement par l'hCG [70]. Une stratégie consistant au soutien intensif de la phase lutéale après un déclenchement par aGnRH permettrait de restaurer un taux de grossesse satisfaisant [71]. Néanmoins, cela n'empêche pas totalement la survenue d'un SHO tardif. Afin d'éviter un SHO tardif et d'optimiser les chances de grossesses, les embryons peuvent être cryoconservés. Le transfert d'embryon se fait alors dans un second temps, en différé [35].

Lorsque le déclenchement ne peut être fait que par l'hCG (en cas de protocole de stimulation utilisant un aGnRH), afin d'éviter un SHO tardif, la stratégie du transfert d'embryon différé peut être mise en place. Cela n'exclut pas le risque de SHO précoce.

### **3.2 Prévention du risque de maladies thromboemboliques**

Les cycles de FIV/ICSI semblent être un facteur de risque de maladies thromboemboliques (MTE), artérielles et veineuses [72–75]. Une particularité de ces thromboses associées aux traitements d'AMP est qu'elles surviennent fréquemment dans des localisations inhabituelles comme les membres supérieurs ou le cou [72]. Suite à un traitement par IVF/ICSI, l'incidence de cette complication varie entre 0,17 et 0,42% dans les études les plus récentes. Cette complication est beaucoup plus élevée qu'en cas de grossesse spontanée, notamment au

premier trimestre de la grossesse où ce risque est 4 à 10 fois supérieur selon les études [75,74,73]. Les facteurs de risque de MTE après AMP sont la présence d'un SHO [RR (95% CI) : 5.4 (2.1–13.7)] ainsi que l'antécédent de syndrome des ovaires polykystiques [RR (95% CI) : 4.8 (1.7–13.4)] [73]. Les autres facteurs habituellement associés comme l'âge, le tabac ou l'indice de masse corporelle (IMC) ne sont plus considérés comme associés significativement au risque de MTE en cas d'AMP [73,74]. L'apparition de MTE lors des grossesses issues de FIV/ICSI est liée à l'augmentation rapide et forte de l'œstradiol lors de la stimulation. Ainsi, le risque de MTE ne semble pas majoré lors des grossesses obtenues après transfert d'embryons congelés [75] étant donné qu'il n'y a pas de SOC juste avant le transfert et que le risque de SHO est inexistant. De la même manière, pour les patientes présentant des maladies auto-immunes à fort risque de MTE [76], il pourrait être intéressant de proposer également un transfert différé. Cela n'a pas été aujourd'hui évalué dans la littérature mais constitue un outil intéressant pour limiter au maximum les risques thromboemboliques induits par la prise en charge en AMP.

## Objectif de l'étude

Une différence majeure entre le transfert d'embryon frais et le TED réside dans l'absence de SOC précédant le transfert d'embryon. La SOC est une étape essentielle de la prise en charge en AMP type FIV / ICSI afin d'induire un développement multi-folliculaire. Cependant, elle pourrait perturber l'interaction entre l'endomètre et l'embryon [77].

L'hypothèse est qu'en transférant l'embryon au cycle suivant sur un endomètre non imprégné par des taux importants de stéroïdes, l'implantation pourrait être améliorée. Plusieurs études rapportent des taux de grossesses améliorés après TED ainsi qu'une amélioration des issues obstétricales et néonatales en comparaison au transfert d'embryon frais. Cependant l'évaluation de la pratique du TED reste complexe: il semble manquer aujourd'hui de preuves scientifiques robustes permettant de généraliser cette pratique et il existe encore une polémique concernant les bénéfices et risques de la stratégie du TED. En outre, la plupart des études portant sur le sujet ont mis l'accent sur le transfert de blastocystes [33,34,36,37,46], les connaissances concernant le transfert d'embryon au stade d'embryon clivé (jour 2-3 du développement embryonnaire ) restent limitées à ce jour.

L'objectif de cette étude est de comparer les résultats de la FIV/ICSI après un transfert d'embryon frais ou un transfert d'embryon différé au stade J2 du développement embryonnaire au sein d'une grande population de femmes infertiles. Ainsi, nous cherchons à identifier un potentiel effet de la stimulation ovarienne sur l'implantation et le taux de grossesse évolutive.

# **Matériel et méthodes**

## **1. Design de l'étude**

Nous avons mené une étude de cohorte incluant, entre le 01/10/2012 et 31/12/2014 dans l'unité de médecine de la reproduction de Cochin Port Royal, les premiers transferts d'embryons autologues réalisés après la SOC. La cohorte a été appariée en fonction de l'âge et du nombre de cycles précédents de FIV/ICSI. Le 'nombre de cycles de FIV/ICSI précédents' est défini comme le nombre de précédentes SOC conduisant à au moins un transfert d'embryon, sans obtention d'une grossesse.

Deux groupes ont été comparés: (i) un groupe "exposé" (le groupe TED), composé de femmes, qui ont un/des embryon(s) congelé(s) puis transféré(s) à J2 en différé et (ii) un groupe contrôle "non exposé" ( le groupe Transfert frais), composé de femmes qui ont reçu un transfert d'embryon(s) J2 frais.

## 2. Constitution de la cohorte et procédure d'appariement

Pour les 2 groupes étudiés, les critères d'inclusion étaient les suivants : Patientes nécessitant une prise en charge en FIV/ICSI, âge  $\leq$  42ans, obtention de moins de 7 zygotes à J1 de la fécondation, patientes ayant au moins un embryon disponible pour le transfert, et un transfert d'embryon au stade J2.

Les critères d'exclusion étaient : une procédure de vitrification ovocytaire, pas d'embryon obtenu ou transféré, et les patientes déjà incluses dans d'autres protocoles de recherche en AMP.

Après une évaluation clinique et para-clinique, les patientes avaient la possibilité de bénéficier d'un transfert d'embryon différé. Les indications du TED étaient les suivantes : (i) Fort risque de syndrome d'hyperstimulation ovarienne (SHO) [34], (ii) élévation de la progestérone au delà de 1.5ng/ml ou endomètre inadéquat le jour du déclenchement de l'ovulation [42], (iii) infertilité en lien avec une endométriose [43], (iv) deux échecs ou plus de FIV/ICSI [37] et (v) un antécédent de maladie auto-immune et/ou patiente à risque élevé de développer une maladie thromboembolique [75,78].

Le protocole de TED était le suivant : La cryopréservation avait lieu à J1 afin de réaliser un transfert d'embryon à J2 si moins de 7 zygotes étaient obtenus. Si plus de 7 zygotes étaient obtenus, la cryopréservation embryonnaire avait lieu au stade blastocyste. Dans cette étude, seules les femmes ayant obtenu moins de 7 zygotes après la fécondation ont pu être analysées (figure supplémentaire 2).

Les critères d'appariement étaient l'âge et le nombre de cycles précédents de FIV/ICSI. Chaque transfert d'embryon différé a été apparié à un transfert d'embryon frais. Le personnel réalisant l'appariement était au courant des critères d'appariement mais aveugle des résultats. Chaque appariement a été utilisé seulement une fois.

### **3. La stimulation ovarienne**

Les femmes ont été prises en charge selon nos protocoles cliniques. Ainsi, tous les patientes ont été synchronisées en utilisant un contraceptif oral contenant 0,03 mg d' Ethynil Estradiol (EE) et 0,15 mg de lévonorgestrel, comme décrit précédemment [79]. Divers protocoles de SOC ont été utilisés selon les pratiques de l'unité, utilisant entre 150 à 450 UI/ jour de FSH recombinante et de FSH urinaire (hMG): (i) le protocole GnRH antagoniste, (ii) le protocole agoniste long, et (iii) le protocole agoniste court [80]. Les doses de gonadotrophines et le type de protocole de SOC ont été déterminés en fonction des caractéristiques individuelles de chaque patiente. La maturation ovocytaire finale a été déclenchée lorsque  $\geq 3$  follicules de  $\geq 17$  mm étaient visibles à l'échographie de monitoring, et lorsque les niveaux d'E2 étaient  $\geq 1000$  pg/mL. (I) Pour le groupe TED, la maturation folliculaire finale a été réalisée en utilisant soit une injection unique de 0,2 mg d'agoniste GnRH (Triptoréline), soit une injection de 250  $\mu$ g de hCG recombinante (rhCG), selon le protocole de SOC. (Ii) Pour le groupe transfert frais, la maturation folliculaire finale a été obtenue en utilisant une injection de rhCG, quel que soit le protocole de stimulation. La ponction ovocytaire a été réalisée par voie trans-vaginale, 35-36h plus tard sous contrôle échographique.

#### **4. Fécondation des ovocytes**

Le sperme a été recueilli par masturbation après une période d'abstinence sexuelle allant de 2 à 5 jours. La FIV ou l'ICSI ont été effectuées selon les paramètres du sperme [81]. La fécondation a été évaluée par la présence de 2 pronuclei (2PN), 17-18 h après l'insémination ou injection des ovocytes.

## **5. Cryopréservation et décongélation des embryons dans le groupe TED**

La vitrification ovocytaire a été réalisée en utilisant le système fermé de vitrification haute sécurité (Cryo Bio System) avec DMSO-EG-S comme cryoprotecteur (Irvine Scientific© Freeze Kit). La procédure de vitrification a été effectuée à température ambiante (entre 20 et 23 ° C). Les zygotes ont été vitrifiés deux par deux. Les zygotes ont d'abord été incubés pendant 1 min dans une gouttelette de 50µl de milieu de culture tamponné à l'HEPES. Ils ont ensuite été transférés dans deux gouttelettes de 50µl de solution d'équilibration diluée contenant 7,5% (v / v) de DMSO et 7,5% (v / v) d'éthylène glycol, et incubés pendant 2 minutes chacun avant d'être transférés dans une troisième gouttelette de solution d'équilibration et incubés pendant 10 min.

Les zygotes ont été ensuite transférés de façon consécutive dans quatre gouttelettes de 25 µl de solution de vitrification (SV) contenant 15% (v / v) de DMSO et 15% (v / v) d'éthylène glycol. Les zygotes ont été incubés pendant 5 secondes dans les gouttelettes 1 et 2, et pendant 10 secondes dans la troisième gouttelette. Ils ont ensuite été transférés dans la quatrième gouttelette et immédiatement chargés sur la paillette CBS-HS. La paillette est scellée à chaud et plongée dans de l'azote liquide. Le temps total nécessaire pour vitrifier les zygotes à partir de la gouttelette 1 de SV au chargement de la paillette et immersion dans l'azote liquide ne dépasse pas 90 secondes.

Le jour avant le transfert d'embryons, tous les zygotes ont été décongelés en utilisant un Kit de décongélation Irvine Scientific. Une boîte de Pétri contenant une gouttelette de 300 µl avec une solution de décongélation (SD: 1,0 M de sucrose dans un milieu HTF tamponné à l'HEPES) a été maintenue à 37 °C.

Afin de décongeler la paillette, elle est transférée du récipient de stockage LN2 à un Dewar de transport qui a été rempli avec de l'azote liquide. Après découpe de la paillette et traction sur

le capillaire, la gouttière est placée dans la gouttelette avec la SD, ce qui permet aux zygotes d'être libérés de la gouttière et maintenus à 37 ° C pendant 1 min. Les zygotes sont ensuite incubés deux fois pendant 1 min à température ambiante dans deux gouttelettes de SD de 50µl. Après cela, les zygotes sont transférés dans la première des deux gouttelettes de 50 µl de solution de dilution (DS: 0,5 M de sucrose dans le milieu HTF, tampon HEPES) suivi d'une incubation de 2 min dans une seconde gouttelette de SD. Enfin, les zygotes sont rincés dans 3 gouttelettes (50µl chacune) d'une solution de lavage (milieu HTF tampon HEPES) pendant 3 min. Les zygotes sont ensuite transférés dans une boîte de culture avec le milieu Global pour évaluer leur survie et pour les maintenir en culture pendant 24h. A J2, les embryons sont morphologiquement évalués selon des critères précédemment publiés [82].

## **6. Le transfert d'embryon**

Dans le groupe Transfert Frais, toutes les femmes ont débuté le traitement par progestérone (200 µg ovule vaginale, 3 par jour) le jour de la ponction ovocytaire, et par œstradiol (E2) par voie trans-dermique (0,2 mg / jour) ou par voie orale (8 mg / jour) 48h après le transfert d'embryon(s). Les embryons J2 sont morphologiquement évalués, et les deux embryons considérés comme étant les plus appropriés sont sélectionnés pour le transfert.

Dans le groupe TED, toutes les femmes ont reçu de la progestérone (une ovule vaginale de 200 µg par jour) pendant 10 jours afin de déclencher une hémorragie de privation. Le transfert d'embryon est programmé 4-5 semaines plus tard. Pour cela, les femmes ont reçu un traitement par Estradiol (E2) par voie trans-dermique (0,2 mg / jour) ou par voie orale (8 mg / jour). Les patientes sont examinées 2-3 semaines après les règles afin d'évaluer l'épaisseur de l'endomètre et de mesurer le taux de progestérone. Lorsque les conditions sont appropriées (l'épaisseur de l'endomètre  $\geq 7$ mm et de progestérone  $<1,5$  ng / ml), un traitement par de la progestérone vaginale est initié à la dose de 200 µg, 3 fois par jour. Les embryons J2 obtenus à partir de zygotes dévitrifiés sont transférés lors du 4ème jour d'exposition de la progestérone. Les deux embryons de meilleure qualité sont choisis pour le transfert. Les femmes enceintes à la suite du transfert poursuivent la progestérone et l'E2 jusqu'à 12 semaines de gestation.

## 7. Analyse des données et statistiques

Les caractéristiques générales des patientes dans les deux groupes ont été enregistrées de façon prospective. Les données suivantes ont été recueillies: l'âge au moment de la ponction (en années), la taille (en mètre), le nombre de cycles précédents de FIV/ICSI, la durée de l'infertilité, le poids (en kilogrammes), l'indice de masse corporelle (IMC, calculé en poids (kg) / [hauteur (m)]<sup>2</sup>), le tabagisme, la réserve ovarienne (FSH, LH, œstradiol, le nombre de follicules antraux (AFC) à J3 du cycle et l'AMH), et la nature de l'infertilité (trouble de l'ovulation, facteur masculin, facteur tubaire, endométriose, idiopathique, une diminution de la réserve ovarienne, ou plus d'une étiologie).

Les grossesses cliniques (GC) ont été déterminées par la présence d'au moins un fœtus avec une activité cardiaque à 6-7 semaines de gestation à l'échographie trans-vaginale [83].

Les grossesses évolutives (GE) ont été déterminées par la présence d'un (ou plusieurs) fœtus intra-utérin(s) avec la présence d'une activité cardiaque à 12 semaines de gestation [84]. Le taux de GE est considéré comme une mesure comparable au taux de naissance vivante [85]. Le taux d'implantation (TI) est le nombre de sac gestationnel observé divisé par le nombre d'embryon(s) transféré(s) [83].

Toutes les données ont été compilées dans une base de données numérique et analysées à l'aide du logiciel SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Une valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme statistiquement significative. Pour l'analyse statistique univariée, nous avons utilisé des tests adaptés pour les groupes appariés: Le test de Mc Nemar pour les variables qualitatives, et le test t apparié de Student pour les variables quantitatives. Pour l'analyse en sous groupes non appariés nous avons utilisé le test  $\chi^2$  de Pearson ou le test exact de Fisher pour les variables qualitatives. Une analyse de régression logistique a été effectuée pour déterminer les variables qui pourraient être associées de façon indépendante à l'obtention

d'une grossesse évolutive, et qui pourraient influencer sur les résultats. Les facteurs potentiels de confusion jugés statistiquement significatifs au seuil de  $p \leq 0,10$  dans l'analyse univariée ont été testés dans un modèle de régression logistique multivarié. L'âge, le nombre de cycles de FIV/ICSI précédentes, l'IMC, les niveaux d'AMH, la dose totale de gonadotrophine injectée, le type de protocole, le nombre de 2PN et le transfert d'au moins un embryon de grade 1 ont été inclus dans l'analyse. Une méthode de sélection de variables pas à pas rétrograde a été utilisée pour conserver les variables avec une valeur de  $p < 0,05$  dans chaque modèle final. Les valeurs des paramètres pour chacun des modèles finaux ont été estimées par la méthode du maximum de vraisemblance. En cas de différences significatives, les odds ratios (OR) et leurs intervalles de confiance à 95% (IC à 95%) ont été calculés à partir des coefficients du modèle et leurs écarts-types.

La taille de notre étude incluant 650 patientes (325 patientes dans chaque groupe) permet de détecter une différence de 10% sur le taux de grossesse évolutive avec une puissance de 80% avec une erreur global de type 1 de 0.05.

# Résultats

## 1. Population étudiée

Le processus de sélection de notre de cohorte est détaillée dans la figure 2. De la cohorte initiale composée de 3.116 procédures de FIV/ICSI réalisées dans notre unité de médecine de la reproduction au cours de la période d'étude, 535 cycles ont été annulés avant le prélèvement d'ovocytes pour des raisons personnelles ou médicales (non-gynécologiques), ou une mauvaise réponse à la SOC. Trois cent vingt ont été exclus de l'étude pour les raisons suivantes: aucun embryon obtenu (n = 247), vitrification ovocytaire (n = 35), ou inclusion dans un autre protocole de recherche en AMP (n = 38). Sur les 2.261 / 3.116 cycles restants, nous avons exclu de l'étude les transferts d'embryons à J5-6 en différé (n = 269), et en frais (n = 25) et les cycles avec obtention de plus de 7 zygotes (n = 346).

Ainsi, 325 cycles avec un TED à J2 et 1.296 cycles avec un transfert frais à J2 étaient disponibles pour l'appariement. Parmi ceux-ci, 325 paires ont été formées d'un transfert frais et d'un transfert différé, appariées selon l'âge et le rang de la FIV/ICSI.

Dans le groupe TED, la répartition des patientes selon les indications étaient les suivantes : (i) un risque de SHO pour 45 femmes (13,85%), (ii) une progestérone élevée ou un endomètre inadéquat le jour de déclenchement pour 43 femmes (13,23%), (iii) une infertilité associée à l'endométriose pour 76 femmes (23,38%), (iv) deux échecs ou plus de FIV/ICSI pour 121 femmes (37,23%), et (v) une maladie auto-immune et / ou un risque élevé de maladie thromboembolique chez 40 femmes (12,31%).

Les caractéristiques des patientes sont détaillées dans la table 1. On observe une différence concernant le taux d'AMH ( $2.87 \pm 2.10$  dans le groupe transfert frais versus  $3.70 \pm 3.50$  ng/ml dans le groupe TED;  $p < 0.001$ ).

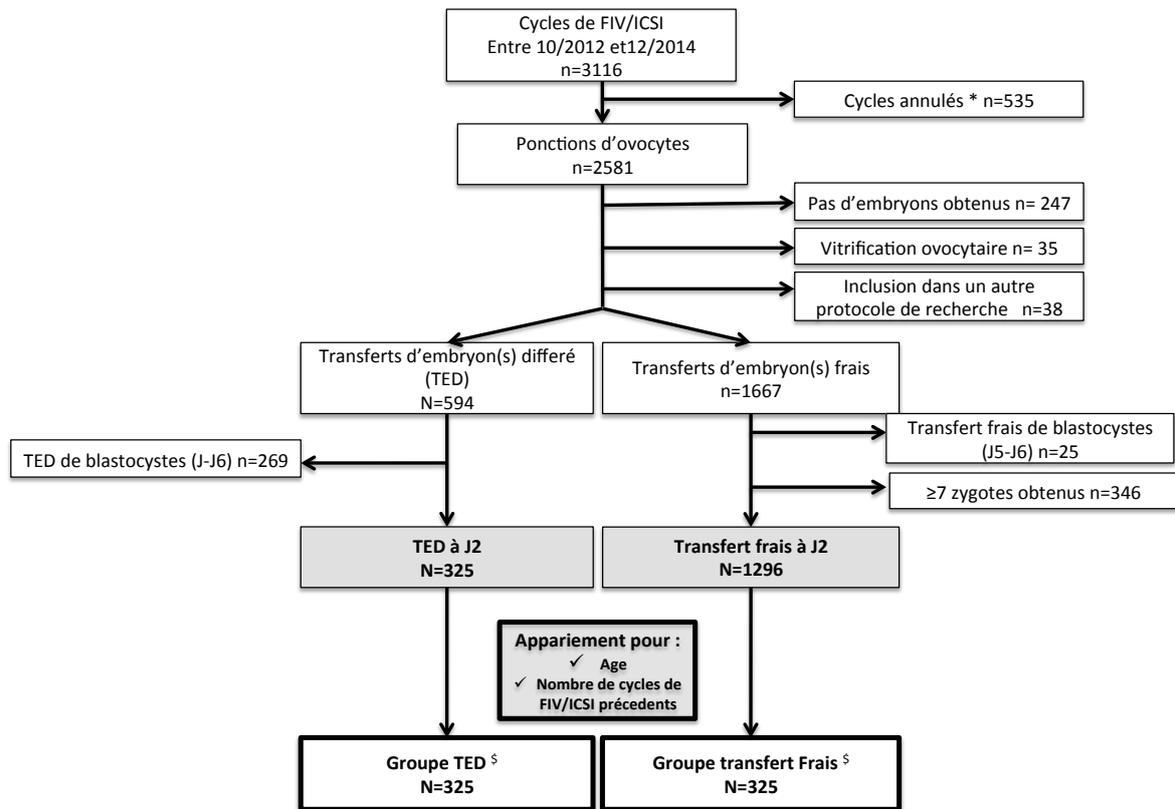


Figure II : Diagramme de flux

\*Cycles annulés: réponse insuffisante à la stimulation ovarienne contrôlée – raison personnelle ou médicale (non gynécologique).

§ Transfert d'embryons au stade J2, cycles de FIV/ICSI avec moins de 7 zygotes obtenus

**Tableau I.** Caractéristiques des patientes du groupe transfert frais (n=325) et du groupe transfert différé (n=325)

	<b>Groupe Transfert frais (n=325)</b>	<b>Groupe TED (n=325)</b>	<b>P value</b>
<b>Age des patientes (années)</b>	35.96 ± 4.4	35.65 ± 4.3	NA
<b>Nombre de cycles précédents de FIV/ICSI</b>	2.41 ± 1.27	2.51 ± 1.33	NA
<b>Durée d'infertilité (année)</b>	4.98 ± 2.91	5.08 ± 2.83	0.495 <sup>Ta</sup>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23.88 ± 4.08	23.66 ± 4.01	0.393 <sup>Ta</sup>
<b>Tabac</b>	29 (8.92)	30 (9.23)	1.000 <sup>Mn</sup>
<b>Cause de l'infertilité :</b>			0.126 <sup>Mn</sup>
· <b>Trouble de l'ovulation</b>	31 (9.54)	35 (10.77)	
· <b>Facteur masculin</b>	125 (38.46)	104 (32.00)	
· <b>Facteur tubaire</b>	37 (11.38)	35 (10.77)	
· <b>Endométriose</b>	49 (15.08)	76 (23.38)	
· <b>Idiopathique</b>	57 (17.54)	52 (16.00)	
· <b>Diminution de la réserve ovarienne</b>	15 (4.62)	9 (2.77)	
· <b>Plus que 1 étiologie</b>	11 (3.38)	14 (4.31)	
<b>Réserve ovarienne :</b>			
· <b>FSH à J3 (UI/L)</b>	7.35 ± 2.31	7.07 ± 2.07	0.094 <sup>Ta</sup>
· <b>LH à J3 (UI/L)</b>	4.85 ± 2.18	4.97 ± 2.53	0.642 <sup>Ta</sup>
· <b>Estradiol à J3 (pg/mL)</b>	46.39 ± 21.91	44.46 ± 24.84	0.319 <sup>Ta</sup>
· <b>CFA à J3</b>	13.17 ± 6.72	14.44 ± 8.28	0.075 <sup>Ta</sup>
· <b>AMH (ng/mL)</b>	2.87 ± 2.10	3.70 ± 3.50	<0.001 <sup>Ta</sup>

TED, Transfert d'embryon différé ; IMC, indice de masse corporelle ; CFA, Compte de follicules antraux ; Les données sont exprimées en moyenne ± erreur standard ou n (%); NA, Non applicable; <sup>Ta</sup>, Paired t test; <sup>Mn</sup>, Mc Nemar test

## 2. Caractéristiques de la procédure de FIV/ICSI

Les caractéristiques de la FIV/ICSI sont présentées dans le tableau II. Le type de protocole de stimulation était significativement différent entre les groupes ( $p < 0,001$ ). Pour le groupe transfert frais, les protocoles agonistes longs et agonistes courts étaient plus fréquents [65 (20,00%) dans le groupe transfert frais contre 22 (6,77%) dans le groupe TED et 64 (19,69%) dans le groupe transfert frais contre 30 (9,23%) dans le groupe TED, respectivement] par rapport au groupe TED. La dose totale de gonadotrophine injectée était significativement plus élevée pour le groupe transfert frais par rapport au groupe TED ( $2710,39 \pm 1056,30$  et  $2466,00 \text{ vs } \pm 857,02$  respectivement;  $p \leq 0,001$ ). D'autre part, par rapport au groupe TED, la durée de la stimulation était plus courte ( $9,56 \pm 1,35$  vs  $10,47 \pm 1,53$ ;  $p < 0,001$ ), le taux d'œstradiol sérique maximale au jour de déclenchement était plus faible ( $1,627.26 \pm 655,90$  vs.  $1,881.05 \text{ } 1,052.84 \pm$ ;  $p < 0,001$ ), et le nombre d'ovocytes matures était plus faible ( $5,43 \pm 2,60$  vs  $6,20 \pm 3,55$ ;  $p < 0,001$   $p = 0,002$ ) pour le groupe transfert frais. Le type de déclenchement était également significativement différent selon les groupes ; pour le groupe transfert frais, seul le déclenchement à l'hCGr était réalisé (tableau 2).

Tableau II. Caractéristiques et résultats de la FIV/ICSI

	Groupe transfert frais (n=325)	Groupe TED (n=325)	p Value
<b>Protocole de stimulation</b>			<0.001 <sup>Mn</sup>
- protocole Long	65 (20.00)	22 (6.77)	
- protocole antagoniste	196 (60.31)	273 (84.00)	
- protocole court	64 (19.69)	30 (9.23)	
<b>Dose totale de gonadotrophines reçue (IU)</b>	2710.39 ± 1056.30	2466.00 ± 857.02	0.001 <sup>Ta</sup>
<b>Durée de la stimulation (jours)</b>	9.56 ± 1.35	10.47 ± 1.53	<0.001 <sup>Ta</sup>
<b>Taux d'œstradiol au déclenchement (pg/ml) <sup>a</sup></b>	1627.26 ± 655.90	1881.05 ± 1052.84	<0.001 <sup>Ta</sup>
<b>Taux de progestérone au déclenchement (ng/ml) <sup>a</sup></b>	0.75 ± 0.35	0.91 ± 0.84	0.001 <sup>Ta</sup>
<b>Type de déclenchement</b>			<0.001 <sup>k</sup>
-rhCG	325(100)	72(22.15)	
- agoniste GnRH	0(0)	253(77.85)	
<b>Nombre d'ovocytes ponctionnés</b>	6.84 ± 3.42	7.90 ± 4.52	0.001 <sup>Ta</sup>
<b>Nombre d'ovocytes matures</b>	5.43 ± 2.60	6.20 ± 3.55	0.002 <sup>Ta</sup>
<b>Nombre d'embryons 2PN</b>	3.41 ± 1.58	3.56 ± 1.72	0.242 <sup>Ta</sup>
<b>Taux de fécondation</b>	68.08±25.40	66.00±27.24	0.309 <sup>Ta</sup>
<b>Nombre total d'embryons décongelés</b>	NA	1134	NA
<b>Taux de survie*</b>	NA	1053/1134 (92.9)	NA
<b>Nombre moyen d'embryons transférés</b>	1.77 ± 0.44	1.72 ± 0.47	0.161 <sup>Ta</sup>
<b>Nombre total d'embryons transférés</b>	574	555	
<b>Qualité des embryons transférés<sup>b</sup></b>			0.115 <sup>k</sup>
<b>Grade 1</b>	141(24.56 <sup>s</sup> )	122(21.98 <sup>s</sup> )	
<b>Grade 2</b>	135(23.52 <sup>s</sup> )	111(20.00 <sup>s</sup> )	
<b>Grade 3</b>	298(51.92 <sup>s</sup> )	322(58.02 <sup>s</sup> )	
<b>Nombre de transfert avec ≥ 1 embryon de grade 1<sup>b</sup> transféré</b>	114(35.08)	104(32.00)	0.275 <sup>Mn</sup>
<b>Taux d'implantation</b>	0.20 ± 0.33	0.17 ± 0.31	0.262 <sup>Ta</sup>
<b>Taux de grossesse clinique</b>	98/325 (30.15)	85/325 (26.15)	0.298 <sup>Mn</sup>
<b>Taux de fausse couche spontanée /GEU<sup>s</sup></b>	27/98 (27.55)	25/85 (25.51)	0.777 <sup>k</sup>
<b>Taux de grossesses multiples</b>	11/98 (11.22)	9/85 (10.59)	0.888 <sup>k</sup>
<b>Taux de grossesses évolutives</b>	71/325 (21.85)	60/325 (18.46)	0.338 <sup>Mn</sup>

TED, Transfert d'embryon différé ; GEU, grossesse extra utérine : <sup>s</sup>1 cas de GEU dans chaque groupe ; Les données sont exprimées en moyenne ± erreur standard ou n (%); NA, Non applicable; <sup>Ta</sup>, Paired t test; <sup>Mn</sup>, Mc Nemar test, <sup>k</sup> Pearson's chi-square test, NA, not applicable; <sup>b</sup> les embryons sont évalués morphologiquement sur des critères précédemment publiés [82], \*nombre d'embryons survivants / nombre total d'embryons décongelés; <sup>s</sup> % calculé sur le nombre total d'embryons transférés

### 3. Résultats de la FIV/ICSI

Le nombre de 2PN obtenus et le taux de fécondation n'étaient pas significativement différents entre les groupes transfert frais et TED (tableau II). Le nombre moyen d'embryon transféré était non significativement différent entre les 2 groupes ( $1,77 \pm 0,44$  pour le groupe transfert frais et  $1,72 \pm 0,47$  pour le groupe TED).

Pour le groupe TED, le taux de survie après décongélation était de 92,9% (tableau II).

La qualité des embryons, évaluée selon un consensus précédemment publié, n'était pas significativement différente entre les groupes (Alpha scientifiques en médecine de la reproduction et de ESHRE Special Interest Group de l'embryologie, 2011).

De plus, dans les deux groupes, le nombre de transferts avec au moins un embryon de grade 1 était similaire (tableau II). Le taux d'implantation ( $0,20 \pm 0,33$  pour le groupe Transfert frais vs.  $0,17 \pm 0,31$  pour le groupe TED;  $p = 0,262$ ), le taux de grossesse clinique [98/325 (30,15%) vs. 85/325 (26,15%) respectivement;  $p = 0,289$ ], et le taux de grossesse évolutive [71/325 (21,85%) contre 60/325 (18,46%) respectivement;  $p = 0,338$ ] n'étaient pas significativement différents pour le groupe TED par rapport au groupe transfert frais. Le taux de fausses couches et le taux de grossesses multiples n'étaient pas significativement différents entre les deux groupes (tableau II). Les facteurs prédictifs indépendants de grossesses évolutives déterminés par analyse de régression logistique sont détaillés dans le tableau III. Les variables retrouvées comme indépendamment associées à une grossesse évolutive étaient les suivantes : (i) l'âge des femmes (OR = 0,92; IC 95%: 0,88 - 0,97), (ii) l'IMC (OR = 0,94; IC 95%: 0,89 - 0,99) , (iii) le nombre d'embryons 2PN (OR = 1,23; IC 95%: 1.04 -1.40) et (iv) et la présence d'au moins 1 embryon transféré de grade 1 (OR = 1,97; IC 95%: 1,26 - 3,05).

Tableau III : Facteurs indépendamment associés à l'obtention d'une grossesse évolutive : analyse multivariée par régression logistique

<b>Paramètres</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>95% IC<sup>a</sup></b>	<b>p</b>
<b>Age de la patiente (année)</b>	0.92	0.88-0.97	0.001
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	0.94	0.89-0.99	0.030
<b>Nombre d'embryons 2PN</b>	1.19	1.04-1.40	0.010
<b>Nombre de transfert avec <math>\geq 1</math> embryon de grade 1<sup>b</sup> transféré</b>	1.97	1.26-3.05	0.003

<sup>a</sup> (95% intervalle de confiance); <sup>b</sup> les embryons sont évalués morphologiquement sur des critères précédemment publiés [82]; IMC, indice de masse corporelle; 2PN, 2 pronuclei.

## Discussion

Cette étude montre que, par rapport à un transfert frais à J2, les résultats de la FIV/ICSI ne sont pas améliorés par le transfert d'embryon différé à J2 sur un cycle à distance de la stimulation ovarienne : nous ne mettons en évidence aucune différence significative concernant le taux d'implantation, le taux de grossesse clinique, ou le taux de grossesse évolutive après un transfert d'embryon frais ou différé.

Une des forces de notre étude est qu'elle aborde un thème encore insuffisamment exploré qu'est le transfert d'embryon différé. Selon nos connaissances, ce travail constitue l'étude avec le plus grand effectif ( $n = 650$ ) qui a regardé les résultats de la FIV/ICSI après un transfert d'embryon à J2 frais par rapport à un transfert différé. La taille de notre échantillon est susceptible d'avoir minimisé les erreurs statistiques. Cette étude est une étude contrôlée avec des groupes qui ont été appariés sur le nombre de cycles précédents de FIV/ISI et sur l'âge des patientes. Ces critères d'appariements ont été choisis afin de réduire au maximum d'éventuels biais. En effet, l'une des principales indications du TED dans notre centre est d'avoir subi au moins deux échecs de FIV/ICSI (37,23%) et l'âge des femmes constitue un facteur pronostique de la réponse ovarienne à la SOC plusieurs fois décrit dans la littérature [86,87]. Les indications de TED proposées aux patientes dans notre centre sont basées sur des indications déjà décrites dans la littérature ; le fort risque de SHO [34,35], en cas d'élévation de la progestérone ou d'endomètre inadapté, afin d'obtenir un environnement intra-utérin plus réceptif au cycle suivant [42], en cas d'échec de FIV/ICSI [37], et en cas d'infertilité associée à l'endométriose [43]. Par ailleurs, afin de réduire le risque thromboembolique ou de le rendre au moins équivalent à une conception naturelle, les femmes atteintes de maladie auto-immune et/ou présentant un risque élevé de maladie thromboembolique pouvaient bénéficier d'un TED en association aux stratégies de préventions classiques [75,78]. Cette étude nous permet d'obtenir une vue d'ensemble, de l'impact du TED à J2 sur les résultats de la FIV/ICSI,

quelques soient les indications du TED. Bien que d'autres études sur le sujet aient déjà été publiées, [34–37,42,88] aucune d'entre elles n'offrent une analyse globale, pour toutes les indications confondues, des résultats du TED à J2 en comparaison au transfert frais. L'impact de la SOC sur l'implantation après un transfert d'embryon au stade J2 a été peu évalué dans les rapports précédents pourtant le transfert d'embryons clivés est une procédure de routine dans de nombreux centres. Ce stade de transfert (J2) est une option intéressante pour assurer un transfert d'embryon chez les patientes ayant obtenu un nombre d'embryons limité [89].

Malgré les précautions prises, il est possible que notre étude souffre de certains biais. Par exemple, les caractéristiques de la SOC diffèrent entre les deux groupes. Pour le groupe Transfert frais, la réponse à la SOC semble plus faible que pour le groupe TED. Bien que la dose totale de gonadotrophines reçue était plus élevée lors de la SOC pour le groupe Transfert frais, le taux d'œstradiol le jour de déclenchement était nettement inférieur à celui du groupe TED. Deux raisons pourraient expliquer ces différences. Tout d'abord, le groupe TED avait de meilleurs paramètres de réserve ovarienne, avec un niveau plus élevé d'AMH. Deuxièmement, lors de la stratégie du TED, le risque de syndrome d'hyperstimulation ovarienne est très faible voir nul, ainsi on tolère un niveau d'œstradiol plus élevé le jour de déclenchement. Ces différences peuvent être responsables d'un plus grand nombre d'ovocytes matures dans le groupe TED. Néanmoins, le taux de fécondation et le nombre d'embryons 2PN ne diffèrent pas significativement entre les deux groupes. Afin de limiter l'effet de ces différences sur nos résultats, nous avons effectué une analyse par régression logistique. Celle-ci montre que les paramètres de la réserve ovarienne ne sont pas indépendamment associés avec les résultats de la FIV/ICSI dans notre étude. En outre, malgré le fait que le groupe TED ait de meilleurs paramètres ovariens, ce groupe n'a pas obtenu de meilleurs résultats en termes de taux de grossesse par rapport au transfert frais. L'analyse multivariée a montré que le nombre d'embryons 2PN était un facteur prédictif indépendamment associé à l'obtention d'une grossesse évolutive. Cependant, le nombre d'embryons 2PN obtenus dans les 2 groupes

était similaire. Il faut se rappeler que seuls les cycles avec moins de 7 embryons 2PN ont été inclus dans l'analyse.

En effet dans notre centre, lorsque moins de 7 zygotes sont obtenus, le transfert se fait systématiquement au stade J2. Si plus de 7 zygotes sont obtenus alors, les embryons sont laissés en culture et le transfert se fait au stade blastocyste. Cette approche a été choisie afin de faire un compromis entre (i) le risque de ne pas avoir d'embryons vitrifiés si tous les embryons sont laissés en culture jusqu'au stade de blastocyste, et (ii) le risque d'augmenter le coût de la prise en charge en FIV/ICSI ainsi que la charge de travail liée à la vitrification si tous les embryons sont vitrifiés au stade zygote. Par ailleurs, selon les protocoles du centre tout au long de la période d'étude, le transfert d'embryon frais était réalisé uniquement au stade J2, quel que soit le nombre de zygotes obtenus après la fécondation. Ainsi, pour éviter un potentiel biais de sélection, nous n'avons étudié que les transferts d'embryons à J2, avec moins de sept 2PN obtenus, pour les deux groupes.

Les embryons ont été transférés dans le groupe TED dans un cycle artificiel, à l'aide d'un traitement séquentiel composé d'estrogène et de progestérone, visant à mimer l'exposition hormonale de l'endomètre dans un cycle naturel. Le transfert d'embryon(s) a été effectué au quatrième jour d'exposition de la progestérone. A ce jour, la préparation de l'endomètre la plus optimale avant un TED reste incertaine [90,91,31,92].

Les avantages du TED sur les taux de grossesses décrits dans d'autres études ne sont pas retrouvés dans cette étude. Bien qu'il persiste une certaine controverse concernant les avantages décrits, la plupart des rapports publiés montrent une amélioration des taux de grossesses après un transfert d'embryon au stade blastocyste et suggèrent que la SOC pourrait nuire à l'implantation [34–37,46,88]. La preuve clinique que la SOC affecte la réceptivité de l'endomètre et l'implantation en cas de transfert de blastocyste n'est pas retrouvée lorsqu'on analyse uniquement le transfert d'embryon au stade J2.

Les mécanismes impliqués dans l'interaction entre l'embryon et l'endomètre sont complexes et ne sont pas entièrement élucidés. Il existe plusieurs hypothèses qui peuvent expliquer ces différences. Tout d'abord, il est considéré comme plausible que les embryons clivés et les embryons blastocystes ne s'adaptent pas de la même manière lorsqu'ils sont exposés à des taux hormonaux dit « supra physiologiques » au moment de l'implantation [77].

Les embryons préimplantatoires sont capables de s'adapter à leur environnement. Cette plasticité passe par des modifications métaboliques et épigénétiques [93,94]. L'activation du génome embryonnaire chez l'Homme a lieu entre le stade 4 et 8 cellules, c'est à dire vers le 3eme jour de développement [95]. Au stade de blastocyste, les effets de la culture embryonnaire pourraient induire des effets durables sur l'expression des gènes [93,94,96]. Plusieurs facteurs en lieu avec cet environnement 'in vitro' peuvent agir directement ou indirectement sur le métabolisme embryonnaire et induire des conséquences négatives sur les étapes d'implantation et de développement embryonnaire [93–97]. Une différence majeure entre ces embryons à J2 et les embryons blastocystes est l'environnement dans lequel ils se développent avant l'implantation. L'activation du génome embryonnaire, les modifications épigénétiques et d'autres modifications morphologiques ont lieu dans cet environnement hormonal « supra physiologique » 'in vivo' en cas de transfert d'embryon(s) à J2. En cas de transfert de blastocystes, ces changements ont lieu 'in vitro' [96,98].

Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que transférer un embryon à J2, avant l'activation du génome embryonnaire, pourrait permettre à cet embryon de s'adapter plus efficacement à l'environnement maternel notamment en cas d'hyperstimulation ovarienne.

Ensuite, dans une étude de Shapiro et al. [36], les auteurs supposent que la SOC pourrait induire une avance de la fenêtre de réceptivité endométriale et que les embryons blastocystes à J6 pourraient être en retard par rapport à la maturation de l'endomètre, compromettant ainsi l'implantation dans une certaine mesure. Le TED pourrait alors permettre une resynchronisation entre l'endomètre et l'embryon à J6. En effet, afin d'étudier les effets de la

SOC sur l'endomètre, les auteurs ont évalué le taux de grossesse évolutive après un transfert de blastocyste unique frais ou congelé. 93 paires d'embryons (frais et congelés) ont été appariés en fonction de certains paramètres embryonnaires et de l'âge de la patiente. Aucune différence significative n'a été observée entre le transfert frais et le transfert différé pour les blastocystes J5. A l'inverse, pour les blastocystes J6, le taux de grossesse était significativement plus élevé après TED. Après un transfert d'embryon à J2, il n'y a actuellement aucun moyen de prédire si l'embryon se développe correctement, ou de déterminer après combien de jours l'embryon aura atteint le stade de blastocyste in vivo (à J5 ou J6) . Ainsi, en cas de transfert d'embryon à J2, la resynchronisation entre l'embryon et de l'endomètre par transfert différé n'est peut être pas nécessaire.

## Conclusion

Dans cette étude de cohorte, les taux de grossesses ne semblent pas améliorés après un transfert différé par rapport à un transfert frais à J2, lorsque l'on étudie globalement les femmes bénéficiant d'un TED, toutes indications confondues. Les résultats de cette étude suggèrent qu'il n'y a pas d'amélioration de l'implantation après un transfert d'embryon à J2 frais par rapport à un transfert différé.

Néanmoins, cette stratégie reste prometteuse. Il existe de nombreuses raisons qui soulignent l'importance de cette technique. Il semble que pour certaines indications précises, le transfert d'embryon différé peut apporter un réel bénéfice par rapport à un transfert frais : C'est le cas (i) lorsque le transfert d'embryon frais est à trop fort risque d'échec de grossesse comme en cas de progestérone élevée ou d'anomalies utérines au moment du transfert ; (ii) lorsque ce transfert frais est à fort risque de complications graves comme le SHO et (iii) sur le plan obstétrical et néonatal, certains risques semblent réduits après un TED en comparaison à un transfert frais comme la prématurité ou les petits poids de naissance. Cependant, certaines études semblent également montrer l'émergence d'autres risques obstétricaux, spécifiques du TED, comme le risque de macrosomie.

Ainsi, les données disponibles restent trop hétérogènes pour pouvoir généraliser cette pratique à toutes les patientes en AMP. Actuellement le niveau de preuve reste insuffisant pour tirer des conclusions solides. Des études randomisées contrôlées, et à plus grande échelle semblent nécessaires afin de confirmer ou infirmer les avantages du TED ainsi que pour déterminer pour quels sous-groupes spécifiques de patientes infertiles le transfert d'embryon(s) différé pourrait être plus efficace et plus approprié par rapport au transfert frais en terme de taux de grossesse mais aussi d'issues obstétricales et néonatales.

## Bibliographie

- [1] Kupka MS, Ferraretti AP, de Mouzon J, Erb K, D'Hooghe T, Castilla JA, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE†. *Hum Reprod Oxf Engl* 2014;29:2099–113. doi:10.1093/humrep/deu175.
- [2] society of Assisted reproductive technology CSR. [https://www.sartcorsonline.com/rptCSR\\_PublicMultYear.aspx?ClinicPKID=0](https://www.sartcorsonline.com/rptCSR_PublicMultYear.aspx?ClinicPKID=0). 2013.
- [3] Pandian Z, Templeton A, Serour G, Bhattacharya S. Number of embryos for transfer after IVF and ICSI: a Cochrane review. *Hum Reprod Oxf Engl* 2005;20:2681–7. doi:10.1093/humrep/dei153.
- [4] Wong KM, Mastenbroek S, Repping S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertil Steril* 2014;102:19–26. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.05.027.
- [5] Bodri D, Guillén JJ, Trullenque M, Schwenn K, Esteve C, Coll O. Early ovarian hyperstimulation syndrome is completely prevented by gonadotropin releasing-hormone agonist triggering in high-risk oocyte donor cycles: a prospective, luteal-phase follow-up study. *Fertil Steril* 2010;93:2418–20. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.08.036.
- [6] Manzanares MA, Gómez-Palomares JL, Ricciarelli E, Hernández ER. Triggering ovulation with gonadotropin-releasing hormone agonist in in vitro fertilization patients with polycystic ovaries does not cause ovarian hyperstimulation syndrome despite very high estradiol levels. *Fertil Steril* 2010;93:1215–9. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.12.019.
- [7] Salamonsen LA, Nie G, Hannan NJ, Dimitriadis E. Society for Reproductive Biology Founders' Lecture 2009. Preparing fertile soil: the importance of endometrial receptivity. *Reprod Fertil Dev* 2009;21:923–34. doi:10.1071/RD09145.
- [8] Casper RF, Yanushpolsky EH. Optimal endometrial preparation for frozen embryo transfer cycles: window of implantation and progesterone support. *Fertil Steril* 2016. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.01.006.
- [9] Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975;122:262–3.
- [10] Nikas G, Develioglu OH, Toner JP, Jones HW. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod Oxf Engl* 1999;14:787–92.
- [11] Ubaldi F, Bourgain C, Tournaye H, Smits J, Van Steirteghem A, Devroey P. Endometrial evaluation by aspiration biopsy on the day of oocyte retrieval in the embryo transfer cycles in patients with serum progesterone rise during the follicular phase. *Fertil Steril* 1997;67:521–6.
- [12] Lass A, Peat D, Avery S, Brinsden P. Histological evaluation of endometrium on the day of oocyte retrieval after gonadotrophin-releasing hormone agonist-follicle stimulating hormone ovulation induction for in-vitro fertilization. *Hum Reprod Oxf Engl* 1998;13:3203–5.
- [13] Zapantis G, Szmyga MJ, Rybak EA, Meier UT. Premature formation of nucleolar channel systems indicates advanced endometrial maturation following controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod Oxf Engl* 2013;28:3292–300. doi:10.1093/humrep/det358.
- [14] Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJC, Fauser BCJM, Heijnen CJ, Macklon NS. Ovarian stimulation for in vitro fertilization alters the intrauterine cytokine,

- chemokine, and growth factor milieu encountered by the embryo. *Fertil Steril* 2010;94:1764–8. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.10.044.
- [15] Mirkin S, Nikas G, Hsiu J-G, Díaz J, Oehninger S. Gene expression profiles and structural/functional features of the peri-implantation endometrium in natural and gonadotropin-stimulated cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5742–52. doi:10.1210/jc.2004-0605.
- [16] Horcajadas JA, Riesewijk A, Polman J, van Os R, Pellicer A, Mosselman S, et al. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Hum Reprod* 2005;11:195–205. doi:10.1093/molehr/gah150.
- [17] Horcajadas JA, Mínguez P, Dopazo J, Esteban FJ, Domínguez F, Giudice LC, et al. Controlled ovarian stimulation induces a functional genomic delay of the endometrium with potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4500–10. doi:10.1210/jc.2008-0588.
- [18] Liu Y, Lee K-F, Ng EHY, Yeung WSB, Ho P-C. Gene expression profiling of human peri-implantation endometria between natural and stimulated cycles. *Fertil Steril* 2008;90:2152–64. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.10.020.
- [19] Haouzi D, Assou S, Mahmoud K, Tondeur S, Rème T, Hedon B, et al. Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Hum Reprod Oxf Engl* 2009;24:1436–45. doi:10.1093/humrep/dep039.
- [20] Mohamed OA, Jonnaert M, Labelle-Dumais C, Kuroda K, Clarke HJ, Dufort D. Uterine Wnt/beta-catenin signaling is required for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8579–84. doi:10.1073/pnas.0500612102.
- [21] Simon C, Oberyé J, Bellver J, Vidal C, Bosch E, Horcajadas JA, et al. Similar endometrial development in oocyte donors treated with either high- or standard-dose GnRH antagonist compared to treatment with a GnRH agonist or in natural cycles. *Hum Reprod Oxf Engl* 2005;20:3318–27. doi:10.1093/humrep/dei243.
- [22] Lee JY, Lee M, Lee SK. Role of endometrial immune cells in implantation. *Clin Exp Reprod Med* 2011;38:119–25. doi:10.5653/cerm.2011.38.3.119.
- [23] Dorfeshan P, Salehnia M, Moazzeni SM. Ovarian stimulation affects the population of mouse uterine NK cells at early pregnancy. *BioMed Res Int* 2013;2013:182531. doi:10.1155/2013/182531.
- [24] Junovich G, Mayer Y, Azpiroz A, Daher S, Iglesias A, Zylverstein C, et al. Ovarian stimulation affects the levels of regulatory endometrial NK cells and angiogenic cytokine VEGF. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989 2011;65:146–53. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00892.x.
- [25] Park JH, Jee BC, Kim SH. Factors influencing serum progesterone level on triggering day in stimulated in vitro fertilization cycles. *Clin Exp Reprod Med* 2015;42:67–71. doi:10.5653/cerm.2015.42.2.67.
- [26] Liu L, Sailan S, Li T, Mariee N, Laird S, Jiang Z, et al. The effect of a high progesterone concentration before oocyte retrieval on the peri-implantation endometrium. *Reprod Biomed Online* 2015;31:739–46. doi:10.1016/j.rbmo.2015.09.003.
- [27] Labarta E, Martínez-Conejero JA, Alamá P, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C, et al. Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis. *Hum Reprod Oxf Engl* 2011;26:1813–25. doi:10.1093/humrep/der126.
- [28] Li R, Qiao J, Wang L, Li L, Zhen X, Liu P, et al. MicroRNA array and microarray evaluation of endometrial receptivity in patients with high serum progesterone levels on the day of hCG administration. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2011;9:29. doi:10.1186/1477-7827-9-29.

- [29] Sonigo C, Dray G, Roche C, Cédric-Durnerin I, Hugues J-N. Impact of high serum progesterone during the late follicular phase on IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2014;29:177–86. doi:10.1016/j.rbmo.2014.03.027.
- [30] Venetis CA, Kolibianakis EM, Bosdou JK, Tarlatzis BC. Progesterone elevation and probability of pregnancy after IVF: a systematic review and meta-analysis of over 60 000 cycles. *Hum Reprod Update* 2013;19:433–57. doi:10.1093/humupd/dmt014.
- [31] Groenewoud ER, Cantineau AEP, Kollen BJ, Macklon NS, Cohlen BJ. What is the optimal means of preparing the endometrium in frozen-thawed embryo transfer cycles? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2013;19:458–70. doi:10.1093/humupd/dmt030.
- [32] Bjuresten K, Landgren B-M, Hovatta O, Stavreus-Evers A. Luteal phase progesterone increases live birth rate after frozen embryo transfer. *Fertil Steril* 2011;95:534–7. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.05.019.
- [33] Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril* 2011;96:344–8. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.05.050.
- [34] Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfers in high responders. *Fertil Steril* 2011;96:516–8. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.02.059.
- [35] Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2013;99:156–62. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.09.003.
- [36] Shapiro BS, Daneshmand ST, Restrepo H, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Matched-cohort comparison of single-embryo transfers in fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 2013;99:389–92. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.09.044.
- [37] Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Freeze-all can be a superior therapy to another fresh cycle in patients with prior fresh blastocyst implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2014;29:286–90. doi:10.1016/j.rbmo.2014.04.009.
- [38] Aflatoonian A, Oskouian H, Ahmadi S, Oskouian L. RETRACTED ARTICLE: Can fresh embryo transfers be replaced by cryopreserved-thawed embryo transfers in assisted reproductive cycles? A randomized controlled trial. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:357–63. doi:10.1007/s10815-010-9412-9.
- [39] Healy MW, Patounakis G, Connell MT, Devine K, DeCherney AH, Levy MJ, et al. Does a frozen embryo transfer ameliorate the effect of elevated progesterone seen in fresh transfer cycles? *Fertil Steril* 2016;105:93–9.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.09.015.
- [40] Özgür K, Berkkanoğlu M, Bulut H, Isikli A, Coetzee K. Higher clinical pregnancy rates from frozen-thawed blastocyst transfers compared to fresh blastocyst transfers: a retrospective matched-cohort study. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:1483–90. doi:10.1007/s10815-015-0576-1.
- [41] Cobo A, Garrido N, Crespo J, José R, Pellicer A. Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients. *Reprod Biomed Online* 2012;24:424–32. doi:10.1016/j.rbmo.2011.12.012.
- [42] Roque M, Valle M, Guimarães F, Sampaio M, Geber S. Freeze-all policy: fresh vs. frozen-thawed embryo transfer. *Fertil Steril* 2015;103:1190–3. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.01.045.

- [43] Mohamed AMF, Chouliaras S, Jones CJP, Nardo LG. Live birth rate in fresh and frozen embryo transfer cycles in women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;156:177–80. doi:10.1016/j.ejogrb.2011.01.020.
- [44] Borghese B, Mondon F, Noël J-C, Fayt I, Mignot T-M, Vaiman D, et al. Gene expression profile for ectopic versus eutopic endometrium provides new insights into endometriosis oncogenic potential. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2008;22:2557–62. doi:10.1210/me.2008-0322.
- [45] Santulli P, Borghese B, Noël J-C, Fayt I, Anaf V, de Ziegler D, et al. Hormonal therapy deregulates prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 (PTGS2) expression in endometriotic tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:881–90. doi:10.1210/jc.2013-2950.
- [46] Zhu D, Zhang J, Cao S, Zhang J, Heng BC, Huang M, et al. Vitri-fied-warmed blastocyst transfer cycles yield higher pregnancy and implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles--time for a new embryo transfer strategy? *Fertil Steril* 2011;95:1691–5. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.01.022.
- [47] Ozgur K, Berkkanoglu M, Bulut H, Humaidan P, Coetzee K. Perinatal outcomes after fresh versus vitri-fied-warmed blastocyst transfer: retrospective analysis. *Fertil Steril* 2015. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.06.031.
- [48] Fang C, Huang R, Wei L-N, Jia L. Frozen-thawed day 5 blastocyst transfer is associated with a lower risk of ectopic pregnancy than day 3 transfer and fresh transfer. *Fertil Steril* 2015;103:655–61.e3. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.11.023.
- [49] Huang B, Hu D, Qian K, Ai J, Li Y, Jin L, et al. Is frozen embryo transfer cycle associated with a significantly lower incidence of ectopic pregnancy? An analysis of more than 30,000 cycles. *Fertil Steril* 2014;102:1345–9. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.07.1245.
- [50] Londra L, Moreau C, Strobino D, Garcia J, Zacur H, Zhao Y. Ectopic pregnancy after in vitro fertilization: differences between fresh and frozen-thawed cycles. *Fertil Steril* 2015;104:110–8. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.04.009.
- [51] Cheng L-Y, Lin P-Y, Huang F-J, Kung F-T, Chiang H-J, Lin Y-J, et al. Ectopic pregnancy following in vitro fertilization with embryo transfer: A single-center experience during 15 years. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2015;54:541–5. doi:10.1016/j.tjog.2015.08.004.
- [52] Santos-Ribeiro S, Tournaye H, Polyzos NP. Trends in ectopic pregnancy rates following assisted reproductive technologies in the UK: a 12-year nationwide analysis including 160 000 pregnancies. *Hum Reprod Oxf Engl* 2016;31:393–402. doi:10.1093/humrep/dev315.
- [53] Imudia AN, Awonuga AO, Kaimal AJ, Wright DL, Styer AK, Toth TL. Elective cryopreservation of all embryos with subsequent cryothaw embryo transfer in patients at risk for ovarian hyperstimulation syndrome reduces the risk of adverse obstetric outcomes: a preliminary study. *Fertil Steril* 2013;99:168–73. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.08.060.
- [54] Maheshwari A, Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2012;98:368–77.e1–9. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.05.019.
- [55] Wennerholm U-B, Henningsen A-KA, Romundstad LB, Bergh C, Pinborg A, Skjaerven R, et al. Perinatal outcomes of children born after frozen-thawed embryo transfer: a Nordic cohort study from the CoNARTaS group. *Hum Reprod Oxf Engl* 2013;28:2545–53. doi:10.1093/humrep/det272.
- [56] Ishihara O, Araki R, Kuwahara A, Itakura A, Saito H, Adamson GD. Impact of frozen-thawed single-blastocyst transfer on maternal and neonatal outcome: an

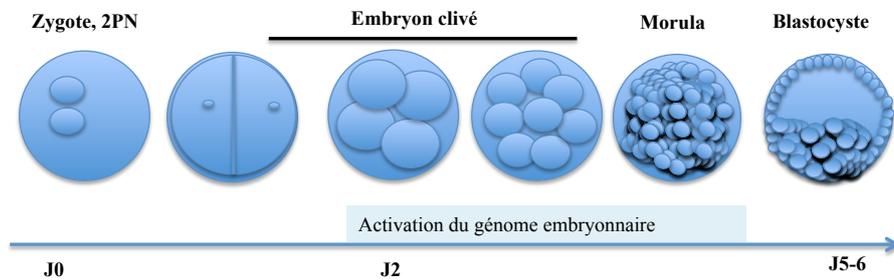
- analysis of 277,042 single-embryo transfer cycles from 2008 to 2010 in Japan. *Fertil Steril* 2014;101:128–33. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.09.025.
- [57] Nakashima A, Araki R, Tani H, Ishihara O, Kuwahara A, Irahara M, et al. Implications of assisted reproductive technologies on term singleton birth weight: an analysis of 25,777 children in the national assisted reproduction registry of Japan. *Fertil Steril* 2013;99:450–5. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.09.027.
- [58] Schwarze J-E, Crosby JA, Zegers-Hochschild F. Effect of embryo freezing on perinatal outcome after assisted reproduction techniques: lessons from the Latin American Registry of Assisted Reproduction. *Reprod Biomed Online* 2015;31:39–43. doi:10.1016/j.rbmo.2015.03.006.
- [59] Pinborg A, Henningsen AA, Loft A, Malchau SS, Forman J, Andersen AN. Large baby syndrome in singletons born after frozen embryo transfer (FET): is it due to maternal factors or the cryotechnique? *Hum Reprod Oxf Engl* 2014;29:618–27. doi:10.1093/humrep/det440.
- [60] Kaser DJ, Melamed A, Bormann CL, Myers DE, Missmer SA, Walsh BW, et al. Cryopreserved embryo transfer is an independent risk factor for placenta accreta. *Fertil Steril* 2015;103:1176–84.e2. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.01.021.
- [61] Opdahl S, Henningsen AA, Tiitinen A, Bergh C, Pinborg A, Romundstad PR, et al. Risk of hypertensive disorders in pregnancies following assisted reproductive technology: a cohort study from the CoNARTaS group. *Hum Reprod* 2015;30:1724–31. doi:10.1093/humrep/dev090.
- [62] Jarvela IY, Pelkonen S, Uimari O, Makikallio K, Puukka K, Ruokonen A, et al. Controlled ovarian hyperstimulation leads to high progesterone and estradiol levels during early pregnancy. *Hum Reprod* 2014;29:2393–401. doi:10.1093/humrep/deu223.
- [63] Sunkara SK, La Marca A, Seed PT, Khalaf Y. Increased risk of preterm birth and low birthweight with very high number of oocytes following IVF: an analysis of 65 868 singleton live birth outcomes. *Hum Reprod Oxf Engl* 2015;30:1473–80. doi:10.1093/humrep/dev076.
- [64] Weinerman R, Mainigi M. Why we should transfer frozen instead of fresh embryos: the translational rationale. *Fertil Steril* 2014;102:10–8. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.05.019.
- [65] Pelkonen S, Gissler M, Koivurova S, Lehtinen S, Martikainen H, Hartikainen A-L, et al. Physical health of singleton children born after frozen embryo transfer using slow freezing: a 3-year follow-up study. *Hum Reprod Oxf Engl* 2015. doi:10.1093/humrep/dev203.
- [66] de Ziegler D, Gambone JC, Meldrum DR, Chapron C. Risk and safety management in infertility and assisted reproductive technology (ART): from the doctor's office to the ART procedure. *Fertil Steril* 2013;100:1509–17. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.10.020.
- [67] Smith V, Osianlis T, Vollenhoven B. Prevention of Ovarian Hyperstimulation Syndrome: A Review. *Obstet Gynecol Int* 2015;2015:514159. doi:10.1155/2015/514159.
- [68] Lamazou F, Legouez A, Letouzey V, Grynberg M, Deffieux X, Trichot C, et al. [Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology, risk factors, prevention, diagnosis and treatment]. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod* 2011;40:593–611. doi:10.1016/j.jgyn.2011.06.008.
- [69] Fatemi HM, Garcia-Velasco J. Avoiding ovarian hyperstimulation syndrome with the use of gonadotropin-releasing hormone agonist trigger. *Fertil Steril* 2015;103:870–3. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.02.004.
- [70] Youssef MAFM, Van der Veen F, Al-Inany HG, Mochtar MH, Griesinger G, Nagi Mohesen M, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist versus HCG for oocyte

- triggering in antagonist-assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;10:CD008046. doi:10.1002/14651858.CD008046.pub4.
- [71] Humaidan P, Engmann L, Benadiva C. Luteal phase supplementation after gonadotropin-releasing hormone agonist trigger in fresh embryo transfer: the American versus European approaches. *Fertil Steril* 2015;103:879–85. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.01.034.
- [72] Chan WS. The “ART” of thrombosis: a review of arterial and venous thrombosis in assisted reproductive technology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009;21:207–18. doi:10.1097/GCO.0b013e328329c2b8.
- [73] Hansen AT, Kesmodel US, Juul S, Hvas AM. Increased venous thrombosis incidence in pregnancies after in vitro fertilization. *Hum Reprod Oxf Engl* 2014;29:611–7. doi:10.1093/humrep/det458.
- [74] Henriksson P, Westerlund E, Wallén H, Brandt L, Hovatta O, Ekblom A. Incidence of pulmonary and venous thromboembolism in pregnancies after in vitro fertilisation: cross sectional study. *BMJ* 2013;346:e8632.
- [75] Rova K, Passmark H, Lindqvist PG. Venous thromboembolism in relation to in vitro fertilization: an approach to determining the incidence and increase in risk in successful cycles. *Fertil Steril* 2012;97:95–100. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.10.038.
- [76] Orquevaux P, Masseur A, Le Guern V, Gayet V, Vauthier D, Boutin D, et al. [In vitro fertilization and systemic lupus erythematosus or antiphospholipid syndrome: An update]. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Française Médecine Interne* 2015;36:154–8. doi:10.1016/j.revmed.2014.08.004.
- [77] Evans J, Hannan NJ, Edgell TA, Vollenhoven BJ, Lutjen PJ, Osianlis T, et al. Fresh versus frozen embryo transfer: backing clinical decisions with scientific and clinical evidence. *Hum Reprod Update* 2014;20:808–21. doi:10.1093/humupd/dmu027.
- [78] Nelson SM. Venous thrombosis during assisted reproduction: novel risk reduction strategies. *Thromb Res* 2013;131 Suppl 1:S1–3. doi:10.1016/S0049-3848(13)00023-6.
- [79] de Ziegler D, Gayet V, Aubriot FX, Fauque P, Streuli I, Wolf JP, et al. Use of oral contraceptives in women with endometriosis before assisted reproduction treatment improves outcomes. *Fertil Steril* 2010;94:2796–9. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.05.056.
- [80] Santulli P, Gayet V, Fauque P, Chopin N, Dulioust E, Wolf JP, et al. HIV-positive patients undertaking ART have longer infertility histories than age-matched control subjects. *Fertil Steril* 2011;95:507–12. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.09.018.
- [81] Fauque P, Léandri R, Merlet F, Juillard J-C, Epelboin S, Guibert J, et al. Pregnancy outcome and live birth after IVF and ICSI according to embryo quality. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:159–65. doi:10.1007/s10815-007-9115-z.
- [82] Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod Oxf Engl* 2011;26:1270–83. doi:10.1093/humrep/der037.
- [83] Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009\*. *Fertil Steril* 2009;92:1520–4. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.09.009.
- [84] Brandes M, Hamilton CJCM, de Bruin JP, Nelen WLDM, Kremer JAM. The relative contribution of IVF to the total ongoing pregnancy rate in a subfertile cohort. *Hum Reprod* 2010;25:118–26. doi:10.1093/humrep/dep341.

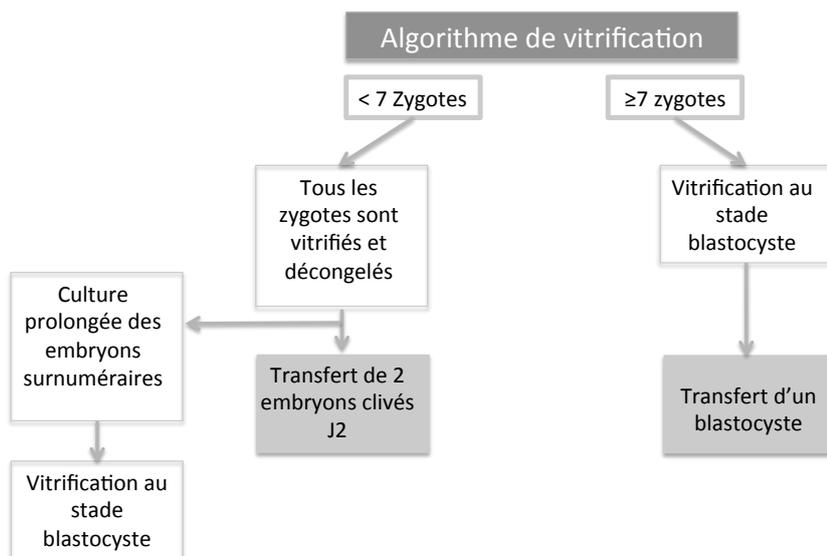
- [85] Clarke JF, van Rumste MME, Farquhar CM, Johnson NP, Mol BWJ, Herbison P. Measuring outcomes in fertility trials: can we rely on clinical pregnancy rates? *Fertil Steril* 2010;94:1647–51. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.11.018.
- [86] Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006;12:685–718. doi:10.1093/humupd/dml034.
- [87] Broekmans FJ, Verweij PJM, Eijkemans MJC, Mannaerts BMJL, Witjes H. Prognostic models for high and low ovarian responses in controlled ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol. *Hum Reprod Oxf Engl* 2014;29:1688–97. doi:10.1093/humrep/deu090.
- [88] Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril* 2011;96:344–8. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.05.050.
- [89] Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;7:CD002118. doi:10.1002/14651858.CD002118.pub4.
- [90] Nawroth F. What is the “ideal” duration of progesterone supplementation before the transfer of cryopreserved-thawed embryos in estrogen/progesterone replacement protocols? *Hum Reprod* 2005;20:1127–34. doi:10.1093/humrep/deh762.
- [91] Escribá M-J, Bellver J, Bosch E, Sánchez M, Pellicer A, Remohí J. Delaying the initiation of progesterone supplementation until the day of fertilization does not compromise cycle outcome in patients receiving donated oocytes: a randomized study. *Fertil Steril* 2006;86:92–7. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.12.048.
- [92] van de Vijver A, Polyzos NP, Van Landuyt L, Mackens S, Stoop D, Camus M, et al. What is the optimal duration of progesterone administration before transferring a vitrified-warmed cleavage stage embryo? A randomized controlled trial. *Hum Reprod Oxf Engl* 2016;31:1097–104. doi:10.1093/humrep/dew045.
- [93] Chason RJ, Csokmay J, Segars JH, DeCherney AH, Armant DR. Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and development. *Trends Endocrinol Metab TEM* 2011;22:412–20. doi:10.1016/j.tem.2011.05.005.
- [94] Mason K, Liu Z, Aguirre-Lavin T, Beaujean N. Chromatin and epigenetic modifications during early mammalian development. *Anim Reprod Sci* 2012;134:45–55. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.08.010.
- [95] Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RAR. Human pre-implantation embryo development. *Dev Camb Engl* 2012;139:829–41. doi:10.1242/dev.060426.
- [96] Anifandis G, Messini CI, Dafopoulos K, Messinis IE. Genes and Conditions Controlling Mammalian Pre- and Post-implantation Embryo Development. *Curr Genomics* 2015;16:32–46. doi:10.2174/1389202916666141224205025.
- [97] Devreker F, Englert Y. In vitro development and metabolism of the human embryo up to the blastocyst stage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;92:51–6.
- [98] Monk D. Germline-derived DNA methylation and early embryo epigenetic reprogramming: The selected survival of imprints. *Int J Biochem Cell Biol* 2015;67:128–38. doi:10.1016/j.biocel.2015.04.014.

# Annexes

**Figure supplémentaire 1: embryogénèse précoce : la première semaine de la vie humaine**



**Figure supplémentaire 2 : Algorithme de vitrification dans le centre selon le nombre de zygotes obtenus**



## **Impact du transfert différé d'embryons J2 sur le taux de grossesse en aide médicale à la procréation : Etude de cohorte**

### **Résumé (français) :**

La stimulation ovarienne contrôlée pourrait avoir des effets néfastes sur la réceptivité de l'endomètre et ainsi limiter le taux de grossesse en FIV/ICSI (fécondation in vitro /intra-cytoplasmic sperm injection). Pour tenter d'améliorer ces taux de grossesses, une nouvelle stratégie est de congeler l'ensemble de la cohorte embryonnaire et de réaliser un transfert d'embryon différé (TED). L'hypothèse est qu'en transférant l'embryon au cycle suivant sur un endomètre non imprégné par des taux importants de stéroïdes, l'implantation pourrait être améliorée. Cependant l'évaluation de cette pratique reste complexe: il semble manquer aujourd'hui de preuves scientifiques robustes permettant de généraliser cette pratique. Par ailleurs, la plupart des études actuelles portent sur le transfert de blastocystes, ainsi les connaissances concernant le TED au stade d'embryon clivé restent limitées à ce jour.

Ainsi, l'objectif de cette thèse est de comparer les taux de grossesses après un transfert d'embryons à J2 frais par rapport à un TED. Pour cela, nous avons mené une étude de cohorte appariée sur l'âge et le nombre de cycles précédents de FIV/ICSI. 325 cycles ont été inclus dans le groupe transfert frais et 325 dans le groupe TED : Il n'y a pas de différence significative entre les groupes concernant le taux d'implantation ( $0,20 \pm 0,33$  versus  $0,17 \pm 0,31$ , respectivement;  $p=0,258$ ) ou le taux de grossesse évolutive (21,85% versus 18,46%,  $p=0,281$ ). Après une analyse par régression logistique, les facteurs prédictifs de grossesse évolutive étaient l'âge (OR=0,92; IC95%:0,87-0,96), l'IMC (OR=0,94; IC95%:0,89-0,99), le nombre d'embryons 2PN (OR=1,23; IC95%:1,08-1,40) et le transfert d'au moins un embryon de grade 1 (OR=1,97; IC95%: 1,26-3,05).

Ces résultats suggèrent que, dans le cas d'un transfert d'embryon au stade J2, les résultats de la FIV/ICSI sont similaires après un transfert frais ou différé.

**Mots clés : Transfert d'embryon frais ; transfert d'embryon différé ; FIV ; ICSI ; AMP**

### **Assisted reproductive technology outcomes after a day 2 fresh versus deferred embryo transfer : A cohort study**

#### **Abstract :**

Controlled ovarian stimulation may have adverse effects on endometrial receptivity and consequently limit pregnancy rates in IVF / ICSI (in vitro fertilization / intra-cytoplasmic sperm injection). In an attempt to improve pregnancy rate, an emerging strategy is to freeze the entire embryo cohort and proceed to a deferred embryo transfer (DET). The hypothesis is that postponing the embryo transfer on a non-hormonally-impregnated endometrium, could improve implantation. However the evaluation of this practice remains complex: today, there is still a lack of robust scientific evidence to generalize this practice. Moreover, most current reports studied the transfer of blastocysts and knowledge about the TED at cleavage stage remains limited to date.

Thus, the objective of this thesis is to compare IVF/ICSI outcomes after a fresh day 2 embryo transfer versus a deferred embryo transfer. We conducted a matched cohort study on age and number of previous IVF / ICSI cycles. 325 cycles were included in the Fresh embryo transfer group and 325 in the DET group: There was no significant difference between groups regarding the implantation rate ( $0.20 \pm 0.33$  versus  $0.17 \pm 0, 31$ , respectively;  $p = 0.258$ ) or the ongoing pregnancy rate (21.85% versus 18.46%,  $p = 0.281$ ). After logistic regression analysis, predictors of ongoing pregnancy were age (OR = 0.92, 95% CI 0.87- 0.96), BMI (OR = 0.94, 95% CI: 0 , 89 - 0.99), the number of 2 PN embryos (OR = 1.23, 95% CI 1.08 - 1.40) and the transfer of at least one grade 1 embryo (OR = 1.97 , 95% CI 1.26 - 3.05).

These results suggest that, in the case of embryo transfer at day 2 stage , IVF / ICSI outcomes are similar after a fresh or a deferred transfer.

**Keywords (english) : Fresh embryo transfer ; deferred embryo transfer ; IVF ; ICSI ; ART**

**Université Paris Descartes  
Faculté de Médecine Paris Descartes  
15, rue de l'École de Médecine  
75270 Paris cedex 06**