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 2018 N° 30

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT

DE

DOCTEUR EN MÉDECINE

Étude prospective randomisée évaluant l'influence de la tension en oxygène sur le développement embryonnaire humain

Présentée et soutenue publiquement
le 30 mars 2018

Par

Pauline MAURIN REYNAUD
Née le 24 mars 1988 à Bourgoin-Jallieu (38)

Dirigée par M. Le Docteur Christophe Sifer, PH

Jury :

M. Le Professeur Jean-Philippe Wolf, PU-PH ……. Président
M. Le Professeur Michaël Grynberg, PU-PH
M. Le Professeur Dominique Porquet, PU-PH
Mme Le Docteur Charlotte Dupont, MCU-PH
Mme Le Docteur Charlène Herbemont, AHU

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

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Philippe Wolf,

Pour votre accueil et votre enseignement durant mon semestre à Cochin, ainsi que pour me faire l'honneur d'accepter de présider le jury de cette Thèse.

A Monsieur le Docteur Christophe Sifer,

Pour cette année passée à tes côtés à Jean-Verdier, ta bonne humeur et l'ambiance chaleureuse que tu arrives à instaurer dans ton laboratoire.

Merci pour ton enseignement, l'opportunité que tu m'as donnée de participer à cette étude passionnante, la confiance que tu m'as accordée durant ce travail et tes nombreux conseils dans la rédaction de cette Thèse.

A Monsieur le Professeur Michaël Grynberg,

Pour ton accueil chaleureux dans ton service, tout ce que j'ai pu y apprendre à tes côtés, ainsi que pour avoir accepté de juger cette Thèse.

A Monsieur le Professeur Dominique Porquet,

Pour l'intérêt que vous manifestez pour notre discipline et pour avoir accepté de faire partie du jury de cette Thèse.

A Madame le Docteur Charlotte Dupont,

Pour ton accueil, ton enseignement et ta bonne humeur.

Merci de m'avoir soutenue et motivée durant ce dernier semestre, pour tous tes conseils au quotidien, et pour tout le reste !

A Madame le Docteur Charlène Herbemont,

Pour m'avoir prise sous ton aile pendant cette année à Jean-Verdier, m'avoir fait découvrir cette discipline avec tant de passion, de rigueur et de professionnalisme.

Un immense merci pour ton amitié et ton soutien précieux dans l'organisation et la rédaction de ce travail.

A l'ensemble de l'équipe de Jean-Verdier,

A tous, techniciennes, secrétaires, infirmières, sage-femme, médecins etc…

Merci pour cette ambiance si particulière dans votre service, et plus particulièrement aux techniciennes, pour votre enseignement, votre bonne humeur à toute épreuve, votre soutien pendant cette année qui a été pour moi riche en émotions. Vous me manquez tous, ne changez rien !

A Madame le Professeur Rachel Levy,

Merci pour votre enseignement, votre accueil si chaleureux dans votre service, votre confiance, et votre bienveillance.

A Madame le Docteur Nathalie Sermondade,

Merci pour tous ces semestres à tes côtés. De Jean-Verdier à Tenon, je n'ai pas pu résister à la tentation de te suivre. Tu as très vite été un modèle pour moi, sur le plan professionnel, mais pas seulement ! Un immense merci pour ta bonne humeur, ton soutien et ton amitié.

A l'ensemble des équipes de Cochin et Tenon,

Merci pour votre accueil durant mes semestres à vos côtés. Vous m'avez tous permis de découvrir différentes facettes de ce métier et j'ai appris énormément de choses grâce à vous.

A mes co-internes,

Sarah, Aymeric et Nicolas, pour m'avoir si bien accueillie pour ce premier semestre d'hémato à l'HEGP, pour tous ces bons moments ensemble et tous ceux à venir (tant de gendronnades en prévision !).

Laura, Sabrina, Saskia et Fanta, merci pour tous ces bons moments !

Julie (morue !), Cochin-Tenon, merci pour ta bonne humeur quoi qu'il arrive !

Mehdi et Olivier, merci pour ces quelques chouettes mois à vos côtés.

Juhayna et Sophie, merci les filles pour ce dernier semestre plein de bonne humeur et de rires ! Et merci de m'avoir soutenue (et supportée !) durant la rédaction de cette Thèse.

A mes parents,

Merci pour…tout ! Votre soutien infaillible, votre confiance, votre présence…

Merci pour tout ce que vous m'avez permis de faire, tant sur le plan professionnel que personnel. Vous m'avez permis de réaliser un rêve il y a déjà de nombreuses années, et pour cela je ne pourrai jamais assez vous remercier.

Merci pour tout ce que vous pu m'inculquer, votre soutien et vos encouragements sans faille malgré mes nombreux doutes.

A mes frères et sœur,

Merci pour cette fratrie incroyable ! Vous m'avez tous soutenue, encouragée et conseillée pendant ces longues années. Ne plus être dans la même ville que vous reste encore difficile mais je doute que ça change un jour. Mais malgré tant de distance, les moments passés ensembles sont toujours aussi chouettes. On est passé de 6 à …19,5 ! Pfiouuuu, mais quel bonheur ! Vous me manquez tous !

A mes belles-sœurs et beau-frère,

La Team Reynaud-Lacoin-Desreux-Bertrand-Maurin ! De si bons moments tous ensembles ! Vous avez agrandi superbement notre famille, merci merci merci !

A ma belle-famille Maurin,

Merci de m'avoir accueillie si chaleureusement depuis toutes ces années au sein de votre famille si soudée.

A tous mes amis,

Médecins ou non, merci d'être là, encore et toujours !

A Baptiste,

Tu es présent à mes côtés depuis quelques temps déjà… et je n'aurais jamais réussi sans ton soutien, tes encouragements et ton amour infaillible. Merci pour tous ces beaux moments vécus ensembles et notre futur à venir.

A Eneko,

Mon petit loup, merci pour tout le bonheur que tu nous apportes déjà depuis ces quelques mois.

Serment d'Hippocrate

« Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les parents des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque. »

Table des matières

Remerciements **2**

Serment d'Hippocrate **6**

Table des matières **7**

Table des figures et tableaux **8**

Abréviations **9**

PARTIE 1 : GENERALITES **10**

I. EVALUATION DE LA QUALITE EMBRYONNAIRE EN AMP **10**

A. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DES EMBRYONS 10

B. NOUVELLES APPROCHES DE LA QUALITE EMBRYONNAIRE 17

II. INTERET DE LA CULTURE PROLONGEE **18**

A. OPTIMISATION DE LA SELECTION EMBRYONNAIRE ET DE L'ISSUE CLINIQUE 19

B. SYNCHRONISATION AVEC L'ENDOMETRE 20

III. EMBRYON : DEVELOPPEMENT & MODIFICATIONS **21**

A. MODIFICATIONS MOLECULAIRES 21

B. MODIFICATIONS METABOLIQUES 21

C. HOMEOSTASIE EMBRYONNAIRE 22

D. LA COMPACTION : UNE ETAPE CLE 22

IV. CONDITIONS DE CULTURE EMBRYONNAIRE **23**

A. LES MILIEUX DE CULTURE 23

B. PARAMETRES INFLUENÇANT LA CULTURE EMBRYONNAIRE 25

C. LE STRESS OXYDATIF 26

D. INTERET DE LA CULTURE EN HYPOXIE POUR LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE : ETAT DE LA LITTERATURE 28

PARTIE 2 : ETUDE **30**

I. OBJECTIFS **30**

II. MATERIEL & METHODES **30**

A. POPULATION 30

B. INTERVENTIONS 31

C. EVALUATION DES DONNEES 36

D. ANALYSES STATISTIQUES 37

E. SUIVI 38

III. RESULTATS **38**

A. DESCRIPTION DES INCLUSIONS 38

B. ETUDE DES DEUX GROUPES DE CULTURE EMBRYONNAIRE PRECOCE (20% *vs.* 5%) 41

C. ETUDE DES TROIS GROUPES AVEC CP (A *vs.* B' *vs.* C) 45

IV. DISCUSSION **49**

V. CONCLUSION **53**

BIBLIOGRAPHIE **54**

Table des figures et tableaux

Figures :

- **Figure 1 (p.11)** : Photographie d'un zygote (2PN, 2GP) à H18
- **Figure 2 (p.11)** : Photographie d'un ovocyte fécondé syngamique à H25 (Magli et *al.*, 2012)
- **Figure 3 (p.12)** : Développement séquentiel optimal d'un embryon de J1 à J2 : 1er clivage (A), 2e clivage (B) puis 3e clivage (C)
- **Figure 4 (p.13)** : Classification des embryons précoces de Médifirst
- **Figure 5 (p.13)** : Taux de fragmentation d'un embryon à J2 : A : 0; B : 0-20; C : 20-50; D : >50%
- **Figure 6 (p.14)** : Embryons de qualité morphologique optimale à J2 (A) et J3 (B)
- **Figure 7 (p.15)** : Développement d'un embryon précoce initiant sa compaction à J3 (A) et évoluant vers le stade morula à J4 (B)
- **Figure 8 (p.16)** : Classification des blastocystes
- **Figure 9 (p.20)** : Cinétique de développement *in vivo* de l'ovocyte à l'implantation embryonnaire
- **Figure 10 (p.26)** : Impact relatif des facteurs de stress physiques et chimiques sur l'embryon préimplantatoire représentant les différences stade-spécifiques de la réponse de l'embryon au stress (Wale and Gardner, 2016)
- **Figure 11 (p.27)** : Les principales ROS, leurs origines potentielles et voies de détoxification (Burton and Jauniaux, 2011)
- **Figure 12 (p.33)** : Incubateur K System G-210 – Origio
- **Figure 13 (p.35)** : Schéma de l'étude
- **Figure 14 (p.40)** : Flow chart de l'étude
- **Figure 15 (p.43)** : Qualité embryonnaire à J2 (A *vs.* B)
- **Figure 16 (p.43)** : Qualité embryonnaire à J3 (A *vs.* B)
- **Figure 17 (p.44)** : Critères de jugement secondaires précoces (A *vs.* B)
- **Figure 18 (p.47)** : Qualité embryonnaire à J5 (A *vs.* B' *vs.* C)
- **Figure 19 (p.47)** : Qualité embryonnaire J5+J6 (A *vs.* B' *vs.* C)
- **Figure 20 (p.48)** : Critères de jugement secondaires (A *vs.* B' *vs.* C)

Tableaux :

- **Tableau 1 (p.41)** : Caractéristiques démographiques et cliniques de la population totale de l'étude (20% *vs.* 5%)
- **Tableau 2 (p.42)** : Issues biologiques précoces de toutes les tentatives de l'étude (A *vs.* B)
- **Tableau 3 (p.44)** : Issues cliniques de toutes les tentatives de l'étude (20% *vs.* 5%)
- **Tableau 4 (p.45)** : Caractéristiques démographiques et cliniques de la population des 3 groupes de CP
- **Tableau 5 (p.46)** : Issues biologiques des tentatives parmi les 3 groupes de CP
- **Tableau 6 (p.48)** : Issues cliniques des tentatives parmi les 3 groupes de CP
- **Tableau 7 (p.52)** : Récapitulatif des résultats des principaux essais contrôlés randomisés évoqués

Abréviations

ABM : Agence de la biomédecine

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMH : Hormone Anti-Müllerienne

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

CCO : Complexe cumulo-ovocytaire

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CI : Confidence Interval

CO_2 : Dioxyde de carbone

CP : Culture prolongée

CPP : Comité de Protection des Personnes

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

FCS : Fausse couche spontanée

FIV : Fécondation *In Vitro*

FSH : Follicle-Stimulating Hormone

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone

H_2O : Eau

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène

hCG : Hormone Chorionique Gonadotrope

ICSI : Intra-Cytoplasmic Sperm Injection

IMC : Indice de masse corporelle

LH : Luteinizing Hormone

MCI : Masse Cellulaire Interne

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NS : Non significatif

O_2 : Oxygène

O_2^- : Anion superoxyde

OATS : Oligoasthénotératozoospermie

OH : Radical hydroxyle

OMS : Organisation mondiale de la santé

$ONOO^-$: Peroxynitrite

OR : Odds Ratio

PN : Pronucléi

PVP : Polyvinylpyrrolidone

ROS : Reactive Oxygen Species

TG : Taux de grossesse

TI : Taux d'implantation

PARTIE 1 : GENERALITES

L'infertilité représente un réel problème de santé publique, puisqu'un couple sur six est amené à consulter pour une prise en charge en Assistance Médicale à la Procréation (AMP). Les données rapportées par l'Agence de Biomédecine (ABM) corroborent ce fait, puisque le nombre de tentatives d'AMP réalisées chaque année en France ne cesse d'augmenter, avec notamment 143 778 cycles rapportés par l'ABM en 2014 (*vs.* 141 297 en 2011), et 25 208 enfants nés (vivants) en 2014 (soit 3,1% des naissances dans la population générale).

Parallèlement à cette demande en perpétuelle augmentation, les techniques de Fécondation *In Vitro* (FIV) connaissent depuis les années 1990 des améliorations remarquables, telles que la mise en pratique de la FIV avec micro-Injection Intra-Cytoplasmique de Spermatozoïdes (ICSI) depuis 1992 (Palermo et *al.*, 1992), la mise au point de la technique de congélation embryonnaire/ovocytaire ultra-rapide, également appelée vitrification, ou l'amélioration des conditions de culture embryonnaire, optimisant le nombre et la qualité des embryons obtenus et permettant, dans certains cas, la pratique de la culture prolongée (CP). La qualité des embryons est primordiale pour la réussite des tentatives d'AMP puisqu'il a été démontré que les taux de grossesse et de naissance (vivante) augmentent avec des embryons de bonne qualité (Fauque et *al.*, 2007).

I. EVALUATION DE LA QUALITE EMBRYONNAIRE EN AMP

L'objectif principal de la sélection embryonnaire est d'identifier l'embryon le plus susceptible de s'implanter. L'évaluation de la qualité embryonnaire repose encore essentiellement sur des marqueurs morphologiques évalués quotidiennement au microscope.

A. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DES EMBRYONS

a. Le zygote, J1 (Papale et *al.*, 2012)

Environ 17 heures (H17 +/- 1 heure pour les ICSI, H18 +/- 1 heure pour les FIV selon le consensus d'Istanbul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011)) après l'insémination/injection, l'ovocyte est observé afin d'évaluer sa fécondation par un spermatozoïde : stade zygote. Ceci se traduit par l'apparition de 2 pronucléi (PN) (1 pronucléus mâle et 1 pronucléus femelle) au sein de l'ovocyte, et l'expulsion du 2^{e} globule polaire signifiant la fin de la méiose de l'ovocyte. Pendant de nombreuses années, ces 2 pronucléi étaient observés en précision (taille, orientation, nombre et polarité des nucléoles) (Nagy et *al.*, 2003; Scott et *al.*, 2000) afin de déterminer la qualité du

zygote (Z-score), mais ceci a été très controversé. Aujourd'hui, à J1, on estime qu'un zygote est utile s'il possède bien ses 2 pronucléi et ses 2 globules polaires (*Figure 1*).

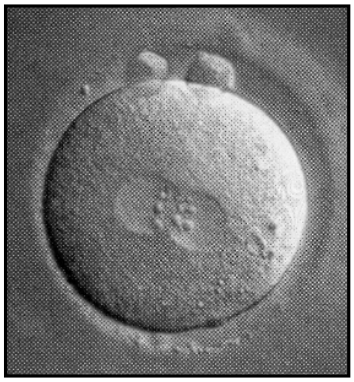


Figure 1 : Zygote (2PN, 2GP) à H18

b. Segmentation : les 1ers clivages

La segmentation (ou clivage) consiste en une succession de divisions cellulaires, à volume embryonnaire constant. A chaque division, la taille des cellules (ou blastomères) diminue, partageant le cytoplasme abondant du zygote entre les cellules filles.

La première segmentation de l'œuf fécondé a lieu à l'idéal autour de la 25^{e} heure après la mise en fécondation, justifiant son observation à ce temps. Les différents stades observables sont :

- zygote (2PN),
- syngamique (correspondant à la fusion des membranes des 2 pronucléi, autour de H23 +/- 1 heure, *Figure 2*),
- premier clivage précoce (normalement autour de H26 (ICSI) ou H28 (FIV) +/- 1 heure), réputé de bon pronostic implantatoire pour l'embryon (Wharf et *al.*, 2004).

Les 2èmes divisions sont asynchrones, de ce fait, on peut observer un stade transitoire à 3 cellules comprenant un gros et 2 petits blastomères (*Figure 3*).

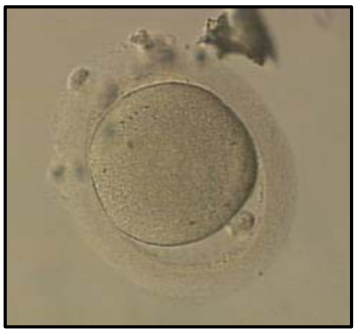


Figure 2 : Ovocyte fécondé syngamique à H25 (Magli et al., 2012)

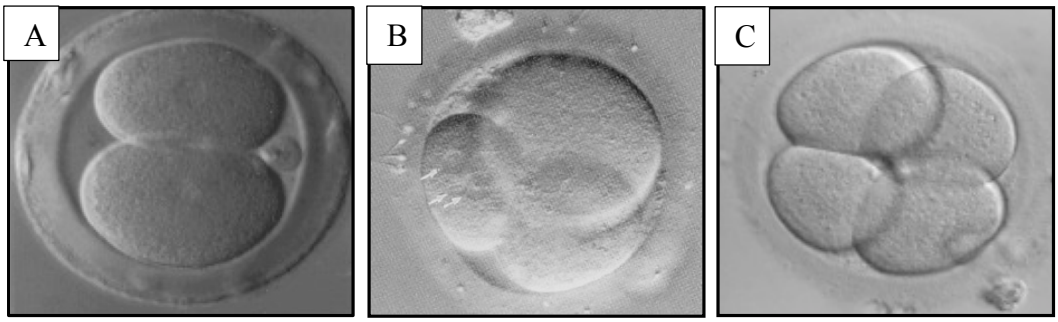


Figure 3 : Développement séquentiel optimal d'un embryon de J1 à J2 : 1er clivage (A), 2e clivage (B) puis 3e clivage (C)

c. L'embryon précoce, J2-J3 (Prados et *al.*, 2012)

L'embryon observé à J2 (H44 +/- 1 heure) et J3 (H68 +/- 1 heure) est appelé embryon précoce. Trois paramètres importants sont observés pour définir la qualité embryonnaire (*Figure 4*) :

❖ **Le nombre de blastomères** (cinétique de division)

Le zygote s'est divisé une première fois (1er clivage) en 2 cellules, puis chaque cellule-mère donne deux cellules-filles, théoriquement identiques.

❖ **L'aspect typique ou non des clivages** (T/A)

Un embryon « typique » possède des blastomères de taille en rapport avec les divisions effectuées (Ziebe et *al.*, 1997) (*Figure 4*) :

- ✓ 2 cellules de taille identique
- ✓ 3 cellules : 1 grande et 2 petites
- ✓ 4 cellules de taille identique
- ✓ 5 cellules : 3 grandes et 2 petites
- ✓ *etc.*

❖ **Le taux de fragmentation** (a/b/c/d)

Le taux de fragmentation cytoplasmique (produits anucléés de divisions anormales des blastomères) de l'embryon, est catégorisé selon 4 grades, en fonction du volume occupé par les fragments par rapport au volume total de l'embryon (*Figure 4*) :

- ✓ A : pas de fragmentation (*Figure 5*A)
- ✓ B : >0-20% de fragmentation (*Figure 5*B)
- ✓ C : 20-50% de fragmentation (*Figure 5*C)
- ✓ D : >50% de fragmentation (*Figure 5*D)

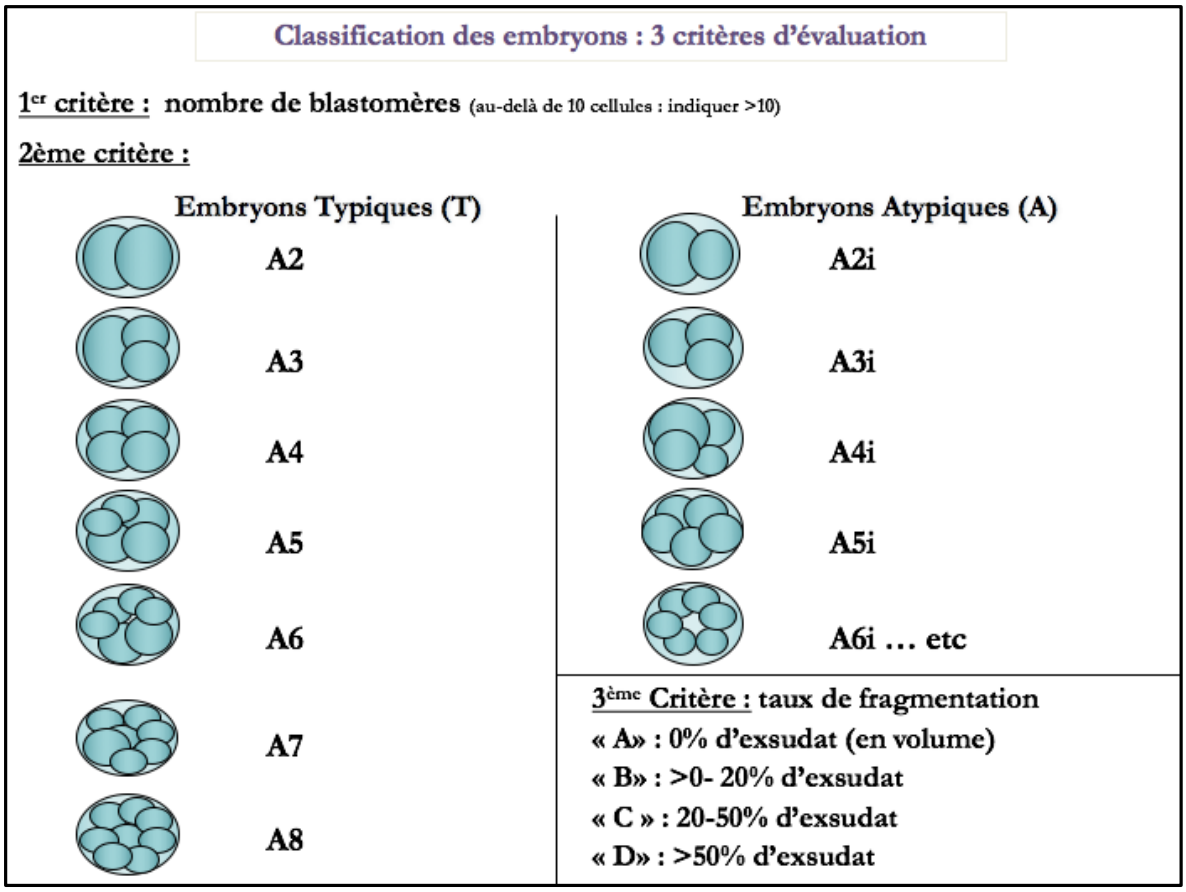


Figure 4 : Classification des embryons précoces de Médifirst

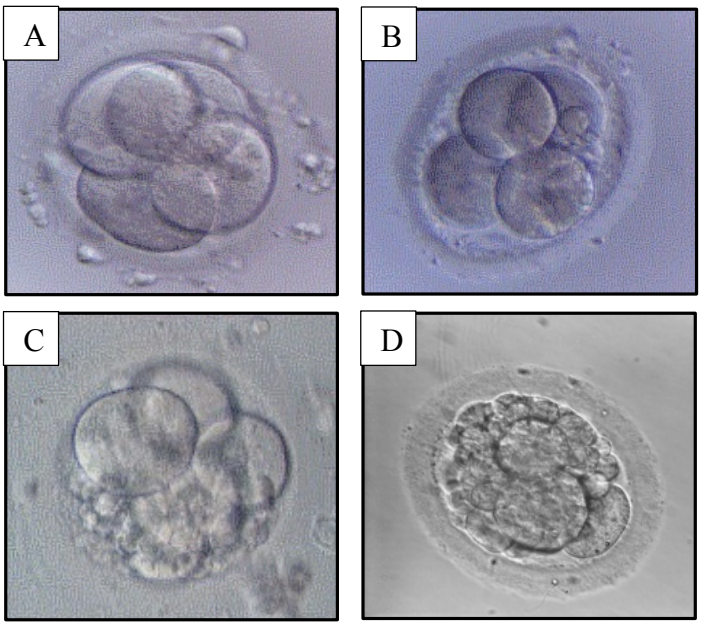


Figure 5: Taux de fragmentation d'un embryon à J2 : A: 0; B: 0-20; C:20-50; D : >50%

Cette fragmentation est observée dans environ 75% des embryons humains obtenus *in vitro* (à différents degrés). Il s'agit d'un phénomène imprévisible et embryon-spécifique puisqu'elle peut affecter certains embryons d'une cohorte, ou tous les embryons, ou aucun. Le

taux de fragmentation est largement utilisé dans tous les scores de qualité embryonnaire, mais ses causes sont encore mal définies. C'est un marqueur de qualité incontournable puisqu'il est généralement admis que les taux d'implantation des embryons ayant moins de 20% de fragments sont peu ou pas différents de ceux des embryons non fragmentés. Pour les embryons ayant entre 20 et 50% de fragments, les taux d'implantation sont diminués. Les embryons ayant plus de 50% de fragmentation sont rarement transférés puisqu'il a été démontré qu'ils permettaient d'obtenir des taux d'implantation et de naissance très faibles (Chi et *al.*, 2011; Fujimoto et *al.*, 2011; Hardy, 1999).

Ainsi, à J2 un embryon dit de « top-qualité » présente 4 cellules, de taille identique, avec moins de 20% de fragments, et 8 cellules à J3 (de taille identique et <20% de fragments) *(Figure 6)*.

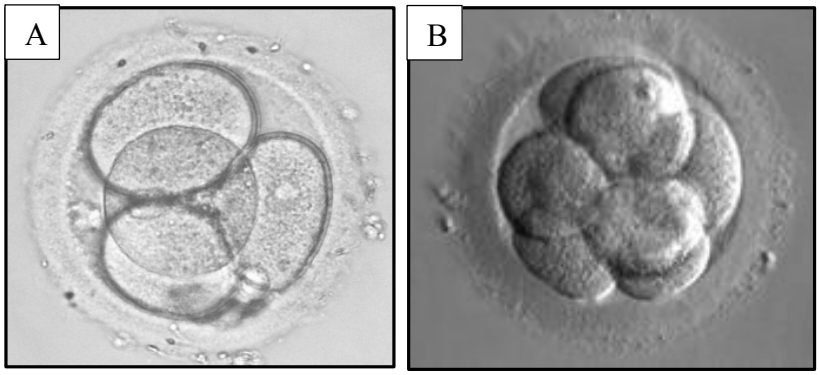


Figure 6 : Embryons de qualité morphologique optimale à J2 (A) et J3 (B)

Ces trois paramètres ont un rôle pronostique largement démontré sur le potentiel implantatoire de l'embryon (Fauque et *al.*, 2007; Giorgetti et *al.*, 1995).

d. La compaction

Au 4^{e} jour environ, à partir d'une douzaine de blastomères, l'embryon prend la forme d'une petite mûre et est appelé « morula », dans laquelle les cellules sont toujours indépendantes mais augmentent leurs contacts intercellulaires (*Figure 7*). Ces contacts engendrent des changements moléculaires de surface, avec mise en place de jonctions adhérentes (rôle dans l'adhésion cellulaire), de jonctions serrées (rôle dans la polarité cellulaire) et jonctions Gap (rôle dans la communication intercellulaire). A la fin de la compaction, les cellules de la morula sont polarisées : les cellules externes protègent les cellules internes du milieu extra-embryonnaire. C'est le début de la différenciation cellulaire qui individualise le trophectoderme de la masse cellulaire interne (MCI).

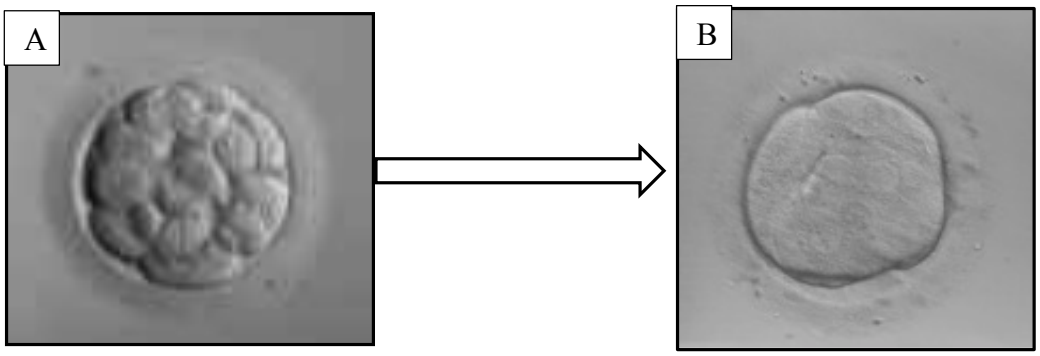


Figure 7 : Développement d'un embryon précoce initiant sa compaction à J3 (A) et évoluant vers le stade morula à J4 (B)

e. La cavitation

Une cavité apparaît ensuite, permise par le maintien d'un gradient osmotique (pompes Na/K-ATPase, imperméabilité intercellulaire, passage d'eau contrôlé par les aquaporines) et des lacunes intercellulaires. Ces lacunes fusionnent en une cavité de plus en plus volumineuse (le blastocèle). L'embryon clivé/précoce devient alors un blastocyste.

f. Le blastocyste : J5-J6 (Hardarson et *al.*, 2012)

Le blastocyste est formé d'une couche de cellules externes aplaties, formant le trophectoderme, de la cavité interne (ou blastocèle**)** et d'un amas de cellules internes plus compactes appelé « masse cellulaire interne ». Lorsque le blastocyste est formé, celui-ci s'expanse, la zone pellucide s'amincit jusqu'à se rompre (sous l'influence d'une protéase sécrétée par le trophectoderme et de contractions répétées du blastocyste), permettant ainsi l'éclosion du blastocyste, indispensable à l'implantation de l'embryon dans la muqueuse utérine.

La qualité d'un blastocyste est évaluée actuellement selon la classification de Gardner (Gardner and Schoolcraft, 1999) (*Figure 8*).

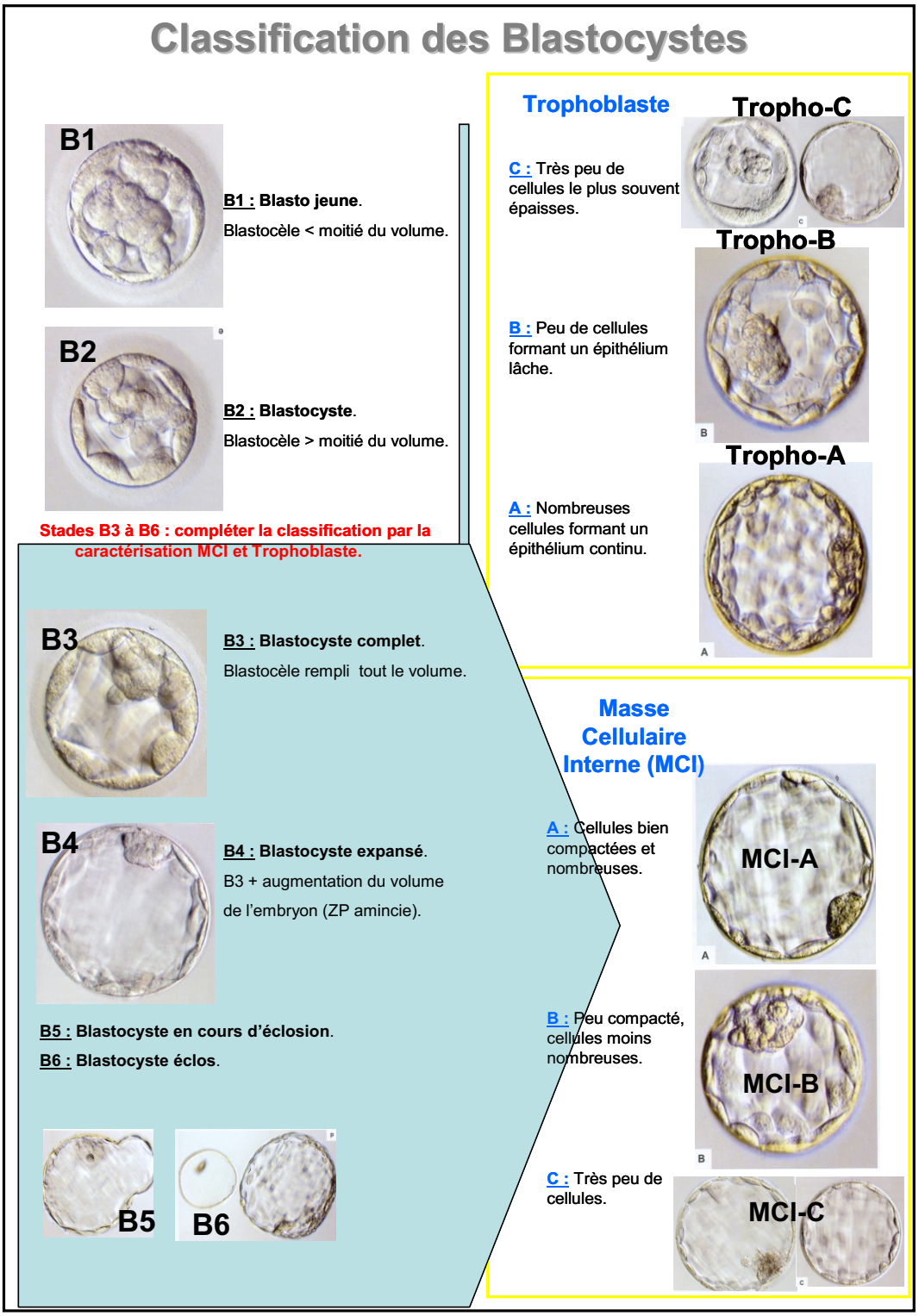


Figure 8 : Classification des blastocystes

B. NOUVELLES APPROCHES DE LA QUALITE EMBRYONNAIRE

a. Evaluation cinétique

Une nouvelle technologie a été développée, appelé « Time-Lapse ». Il s'agit de caméras permettant l'observation quasi-continue du développement des embryons sans les sortir des incubateurs (culture ininterrompue). Cela permet d'une part de limiter l'exposition des embryons aux facteurs externes tels que la lumière, les variations de température, *etc.*, et, d'autre part, d'avoir un regard sur la cinétique de développement de l'embryon (en dépassant les limites d'une seule observation quotidienne à un instant t). Nous pouvons ainsi évaluer la cinétique des divisions cellulaires, et l'apparition/disparition des noyaux. Le Time-Lapse a été utilisé essentiellement pour décrire les évènements de fécondation et le développement embryonnaire précoce (Payne et *al.*, 1997), ainsi que les aspects morphodynamiques de la fragmentation embryonnaire (Van Blerkom et *al.*, 2001). Pribensky et *al.* ont réalisé une méta-analyse de cinq essais contrôlés randomisés, dans laquelle ils mettent en évidence une amélioration des issues cliniques avec l'utilisation du Time-Lapse (meilleurs taux de grossesse clinique et de naissance vivante et moindre taux de fausse couche précoce) (Pribenszky et *al.*, 2017). Ces résultats pourraient être en relation avec l'amélioration des conditions de culture permise par la culture ininterrompue (stabilité optimale des conditions de culture), ou à une sélection plus pertinente des embryons par l'observation quasi-continue permettant une datation morphocinétique précise de l'évolution embryonnaire. Néanmoins, même si les résultats de la méta-analyse de Pribensky et *al.* semblent en faveur de la culture en condition Time-Lapse, aucune conclusion générale ne peut encore être tirée car ils sont obtenus en incluant des études analysant des populations hétérogènes et de méthodologie peu robuste. Actuellement, il n'y a pas de consensus quant à l'efficacité de Time-Lapse à sélectionner les embryons utiles, probablement du fait de l'absence d'un algorithme universel (Barberet et *al.*, 2018).

b. Evaluations non morphologiques ou « omiques »

La biologie systémique est une science nouvelle décrivant et prédisant le fonctionnement des systèmes vivants, à partir de la connaissance de leurs composants et des relations entre ces composants. Elle utilise une approche globale avec des outils de haute technologie pour identifier et quantifier, non seulement tous les gènes d'un génome, mais aussi tous les ARN et protéines d'une cellule (**transcriptomique** et **protéomique**) ou tous les métabolites impliqués (**métabolomique**).

En comparant les transcriptomes de blastocystes par micro-array, une équipe a, par exemple, identifié plus de 7000 transcrits exprimés exclusivement dans les blastocystes « viables », soit autant de pistes à explorer pour identifier de nouveaux marqueurs de compétence embryonnaire (Jones et *al.*, 2014). Une autre équipe a, quant à elle, mis en évidence des profils protéiques associés à un arrêt de développement (Katz-Jaffe et *al.*, 2006). Des études

prospectives récentes ont aussi retrouvé une corrélation entre le profil métabolique (métabolome) embryonnaire évalué dans le milieu de culture et la survenue d'une grossesse, venant compléter les informations apportées par la morphologie (Krisher et *al.*, 2015). Néanmoins, les évaluations génomiques et transcriptomiques sont des méthodes invasives (diminution des taux de grossesse après biopsie de blastomères (Mastenbroek et *al.*, 2007)) et donc difficilement applicables en routine. Si les évaluations protéomiques et métabolomiques ne sont, quant à elles, pas invasives, leur développement clinique est encore à l'étude. Cependant, la combinaison d'un dosage quantitatif et non invasif examinant le métabolome embryonnaire et/ou le sécrétome protéomique en combinaison avec l'évaluation morphologique pourrait représenter une amélioration significative des techniques de sélection embryonnaire et améliorer les issues cliniques en AMP (Krisher et *al.*, 2015).

c. Evaluation métabolique

En ce qui concerne l'évaluation du métabolisme embryonnaire, la mesure non invasive des taux de respiration embryonnaire permettrait de prédire quels sont les embryons qui vont arrêter leur développement (Lopes et *al.*, 2007; Scott et *al.*, 2008). De même, différents auteurs ont mis en évidence une corrélation entre le métabolisme de certains acides aminés ou de certains acides gras, en quantifiant leur turn-over dans le milieu de culture embryonnaire par des techniques de chromatographie (Lee et *al.*, 2015).

Ces méthodes d'évaluation du potentiel implantatoire de l'embryon, certes intéressantes sur le plan théorique, sont toutefois coûteuses, ou difficiles à mettre en place dans la pratique quotidienne au laboratoire, et ne supplantent pas les méthodes morphologiques actuelles.

II. INTERET DE LA CULTURE PROLONGEE

L'amélioration des conditions de culture et la maîtrise des techniques de congélation des blastocystes (vitrification) ont permis l'essor de la culture embryonnaire dite « prolongée » (CP), jusqu'à l'obtention du stade blastocyste (J5-J6).

La CP est utilisée dans près de 25% des tentatives de FIV, et 39% des transferts d'embryons congelés. Selon l'ABM, en France en 2014, le taux de blastoformation était de 66,4%, dont 41% de blastocystes de bonne qualité (transférés ou congelés). Leur taux d'implantation était aux alentours de 29% par blastocyste transféré. La part des enfants nés après FIV avec CP était de 23,4%.

A. OPTIMISATION DE LA SELECTION EMBRYONNAIRE ET DE L'ISSUE CLINIQUE

L'objectif de la CP est d'augmenter les chances de sélectionner le/les embryon(s) ayant le meilleur potentiel implantatoire, tout en limitant le nombre d'embryons transférés et de fait le risque de grossesse multiple.

De nombreuses études se sont intéressées aux taux de succès du transfert au stade blastocyste *vs.* embryon clivé. Celles-ci ont pu montrer une augmentation des taux d'implantation lors du transfert frais de blastocyste (Gardner et *al.*, 1998a), de même pour les taux de naissance vivante (Papanikolaou et *al.*, 2006) (Papanikolaou et *al.*, 2005). Une méta-analyse récente regroupant 27 essais (Glujovsky and Farquhar, 2016) a d'ailleurs confirmé l'intérêt de la CP pour améliorer l'issue clinique de la tentative, et ce dans les populations de bon et de mauvais pronostic.

En effet, de nombreux embryons préimplantatoires sont porteurs d'anomalies chromosomiques susceptibles d'affecter leur développement et ainsi la réussite de la tentative d'AMP (Katz-Jaffe et *al.*, 2004; Laverge et *al.*, 1997; Magli et *al.*, 2001). Le risque d'aneuploïdie des ovocytes et des embryons humains augmente avec l'âge maternel (Dailey et *al.*, 1996; Márquez et *al.*, 2000), et est corrélé à une diminution du taux d'implantation et un taux de fausse couche plus élevé. Les embryons aneuploïdes auraient tendance à cesser leur développement après J3. Dans ce sens, le transfert au stade blastocyste permettrait une désélection des embryons aneuploïdes et ainsi une augmentation des taux d'implantation (Fragouli and Wells, 2011; Schoolcraft et *al.*, 2010; Staessen et *al.*, 2004).

Cependant, en cas de CP, le risque d'échec de transfert est statistiquement plus élevé que lors de transferts à J2/J3 (OR 2.50, 95% CI 1.76 to 3.55) (Glujovsky et *al.*, 2016), et montre l'intérêt d'identifier des marqueurs prédictifs de la blastoformation. Certaines études suggèrent que le nombre de blastomères (Langley et *al.*, 2001; Neuber et *al.*, 2003; Racowsky et *al.*, 2000) et le taux de fragmentation (Shoukir et *al.*, 1998) à J3 seraient prédictifs du taux de blastoformation, mais pas de leur qualité. Le taux de blastoformation peut varier de 0% à 100% dans certains cas (Gardner et *al.*, 1998a), et l'incidence d'annulation du transfert est plus élevée dans les populations non-sélectionnées (Papanikolaou et *al.*, 2008). Certains facteurs cliniques tels que : l'âge jeune de la femme, la réserve ovarienne, l'absence d'infertilité masculine, ainsi qu'une infertilité secondaire, ont été identifiés comme prédictifs de blastoformation et survenue de grossesse après transfert d'un blastocyste (Thomas et *al.*, 2010). Néanmoins, la CP permet la congélation d'embryons surnuméraires au stade blastocyste, jugés de mauvaise qualité au stade précoce (Guerif et *al.*, 2009, 2011; Sallem et *al.*, 2017). D'ailleurs, il a été montré qu'un blastocyste de bonne qualité possède les mêmes chances d'implantation quelle que soit sa qualité observée à J2/3 dont il est issu (Herbemont et *al.*, 2017).

Considérant tous ces éléments, il semble important dans certaines situations (couples avec antécédents d'échec de recueil, âge de la femme élevé, baisse de réserve ovarienne *etc.*) d'informer les couples du risque important d'annulation du transfert après CP.

B. SYNCHRONISATION AVEC L'ENDOMETRE

In vivo, l'ovocyte et les spermatozoïdes se rencontrent dans la partie distale/ampullaire de la trompe, puis l'embryon se dirige vers l'utérus, dans lequel il s'implantera au stade de blastocyste environ 7 à 8 jours après la rencontre entre les gamètes (*Figure 9*). Lors d'un transfert embryonnaire à J2 ou J3, l'embryon est donc exposé prématurément à l'environnement utérin, qui est différent de l'environnement tubaire (Gardner et *al.*, 1996), ce qui pourrait nuire à son développement.

Ainsi, une meilleure synchronisation endomètre-embryon pourrait être en cause dans l'amélioration des taux d'implantation après transfert d'un blastocyste (*vs.* embryon clivé) (Papanikolaou et *al.*, 2008; Zech et *al.*, 2007).

Par ailleurs, dans le cadre d'une stimulation ovarienne, une augmentation de la contractilité utérine est observée à partir du déclenchement de l'ovulation, et se stabilise après 7 jours. Cette relaxation utérine pourrait ainsi contribuer à faciliter l'implantation du blastocyste (Fanchin et *al.*, 2001).

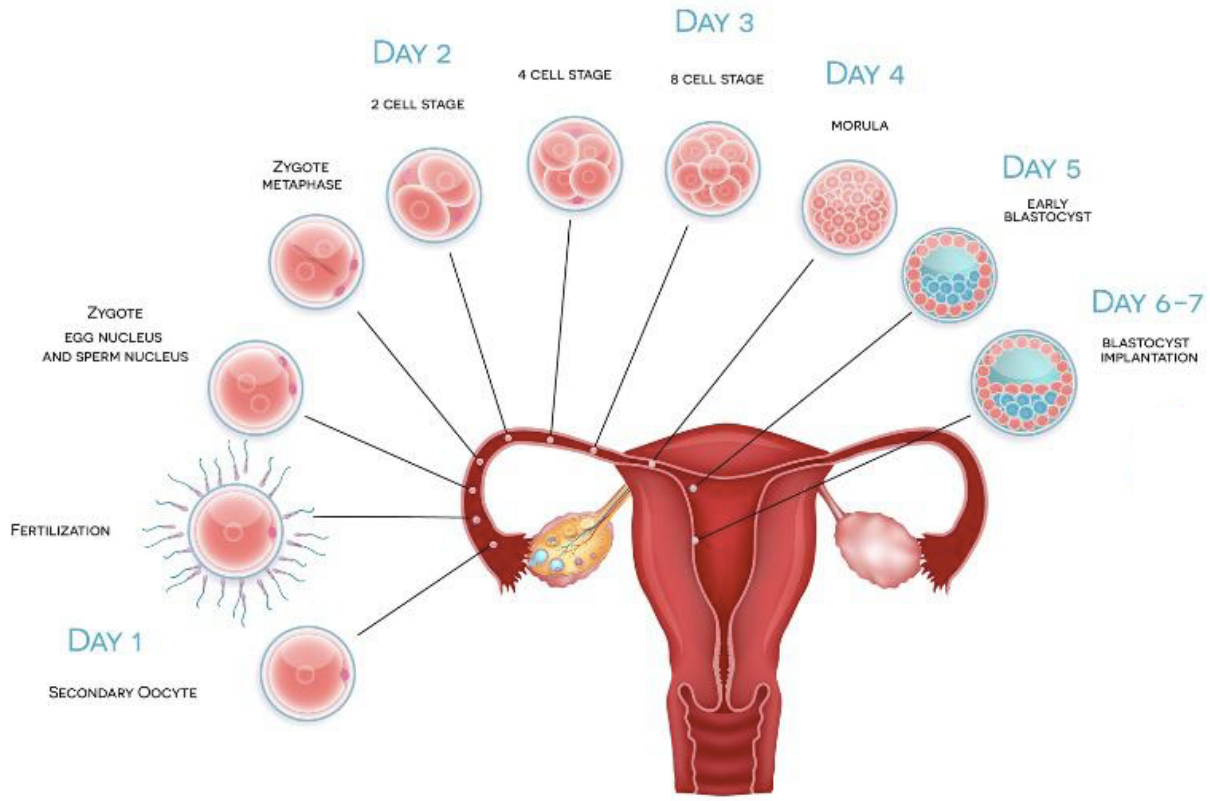


Figure 9 : Cinétique de développement in vivo de l'ovocyte à l'implantation embryonnaire (site magrossessenaturelle.com)

III. EMBRYON : DEVELOPPEMENT & MODIFICATIONS

Tout au long de son développement, l'embryon subit de nombreuses modifications (structurelles, moléculaires, métaboliques *etc.*). Les conditions de culture doivent s'adapter à toutes ces modifications afin de se rapprocher le plus possible de la physiologie et permettre un développement embryonnaire optimal. Des conditions (physiques et chimiques) sub-optimales pendant la culture embryonnaire peuvent nuire au développement des embryons (Wale and Gardner, 2016).

A. MODIFICATIONS MOLECULAIRES

Après la fécondation, le génome gamétique reste silencieux, et subit une reprogrammation via plusieurs phénomènes tels qu'un remodelage de la chromatine (remplacement et modification des protéines liées à l'ADN) et des modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN, empreinte parentale). La formation du génome embryonnaire (au stade zygote) passe par des modifications des enveloppes nucléaires des pronucléi, mais celui-ci n'est activé qu'après les premiers clivages. Ainsi, avant cette activation, le développement dépend donc strictement de l'héritage maternel en ARN et protéines présents dans l'ovocyte et accumulés pendant la période de croissance et de maturation avant l'ovulation, rendant l'embryon aux stades précoces extrêmement sensible à son environnement.

L'activation du génome embryonnaire est un phénomène contrôlé, avec tout d'abord, aux stades de 2 à 4 cellules, la mise en place de la machinerie cellulaire de base (phase dite mineure, à activités métabolique et de biosynthèse réduites, ne nécessitant pas la présence de facteurs de transcriptions spécifiques) ; puis, à partir de 8 cellules, la préparation des évènements morphologiques ultérieurs (compaction, cavitation, différenciation), qui est une phase majeure avec augmentation rapide de synthèse des transcrits. A partir de cette activation, les ARN et protéines nouvellement synthétisés sont indispensables au développement de l'embryon.

B. MODIFICATIONS METABOLIQUES

Les embryons subissent des modifications de leurs préférences nutritionnelles au fur et à mesure de leur développement (du zygote au blastocyste) (Lane and Gardner, 2007). Le zygote est initialement au repos, avec une faible activité métabolique et biosynthétique. L'embryon précoce utilise principalement des acides carboxyliques (pyruvate et lactate) (Gardner et *al.*, 2001; Gott et *al.*, 1990; Hardy et *al.*, 1989) comme substrats énergétiques, ainsi que des acides aminés non essentiels comme l'aspartate (Lane and Gardner, 2005); il dépend donc entièrement des mitochondries (métabolisme à base d'ATP). Il utilise de très faibles

quantités de glucose (Gott et *al.*, 1990; Hardy et *al.*, 1989), supposé être métabolisé par la voie des pentoses phosphates pour maintenir le pouvoir réducteur des cellules, en particulier dans la production de glutathion, ayant un rôle dans la protection contre le stress oxydatif. Le métabolisme du glucose, même s'il est très faible pendant ces premières étapes de développement préimplantatoire, est essentiel pour les développements métaboliques ultérieurs. L'activation du génome embryonnaire est concomitante avec l'augmentation de la biosynthèse et le changement de préférence nutritionnelle pour un métabolisme à base de glucose (nutriment principal du blastocyste) (Gott et *al.*, 1990; Hardy et *al.*, 1989). Le blastocyste métabolise presque tout le glucose absorbé par le cycle tricarboxylique et la glycolyse aérobie (30 à 50% du glucose étant converti en lactate) (Gardner and Leese, 1990; Lane and Gardner, 1998). Cette conversion inhabituelle du glucose en lactate en présence de niveaux importants d'oxygène, résulterait de la forte demande de biosynthèse.

La disponibilité des nutriments change le long du tractus génital féminin (de la trompe à l'utérus) en fonction des besoins de l'embryon : il y a un gradient décroissant de pyruvate et de lactate, tandis qu'inversement, le glucose augmente (Gardner et *al.*, 1996). Ces modifications reflètent le passage d'un métabolisme à base d'acide carboxylique à un métabolisme à base de glucose dans l'embryon.

C. HOMEOSTASIE EMBRYONNAIRE

Au cours de son développement, l'embryon subit également des modifications de ses fonctions de régulation ionique (Lane and Gardner, 2007). L'ovocyte puis l'embryon juste après la fécondation ne possèdent pas de système de transport actif pour réguler leur pH intracellulaire (Baltz et *al.*, 1990; Phillips and Baltz, 1999). Ces systèmes apparaissent seulement 6 à 8 heures après la fécondation, et ne seront pleinement fonctionnels qu'après 10 heures. Les régulateurs des fonctions homéostatiques comme les acides aminés (protection contre le stress ionique et le pH) sont donc des composants essentiels du milieu de culture pour les embryons précoces.

D. LA COMPACTION : UNE ETAPE CLE

La compaction, avec l'apparition des jonctions serrées, permet la mise en place d'un épithélium de transport fonctionnel qui permet à l'embryon de mieux réguler son homéostasie et d'être ainsi moins sensible aux modifications de son environnement. En effet, l'embryon augmente sa capacité de régulation contre le stress ionique (diminution de sa dépendance aux osmolytes externes en réponse à de forts taux de sel dans le milieu) (Hammer and Baltz, 2003; Lane and Gardner, 2001; Steeves and Baltz, 2005) ainsi que celle de régulation de son pH intracellulaire.

IV. CONDITIONS DE CULTURE EMBRYONNAIRE

In vivo, l'embryon se développe et se déplace continuellement au sein de quelques centaines de nanolitres d'un fluide visqueux complexe, contenant des taux élevés d'albumine et d'aminoglycanes, et dans un environnement où la concentration en oxygène est faible (2 à 8 %). Les conditions *in vivo* diffèrent fortement des conditions *in vitro* où l'embryon est en position statique, exposé à de nombreux facteurs exogènes auxquels il doit s'adapter. Les laboratoires d'AMP tentent depuis de nombreuses années d'adapter au mieux les conditions de culture *in vitro* afin de se rapprocher au maximum des conditions physiologiques.

A. LES MILIEUX DE CULTURE

Le milieu de culture est un facteur clé pour permettre un développement optimal de l'embryon. Néanmoins, même le meilleur milieu de culture ne reproduit que partiellement l'environnement physiologique et oblige ainsi l'embryon à s'adapter (Biggers, 1998).

a. Composants clés des milieux de culture

Les composants essentiels à la culture embryonnaire et présents dans l'ensemble des milieux commerciaux sont :

- **Le glucose** (substrat énergétique), dont la concentration nécessaire varie selon le stade embryonnaire. De nombreuses études ont montré que de grandes concentrations de glucose entraînent un retard ou un arrêt de développement de l'embryon clivé (diminution de la fonction mitochondriale, donc diminution d'ATP) mais qu'il est indispensable pour le blastocyste (sinon perte de viabilité) *(Gott* et *al., 1990; Hardy* et *al.*, 1989) ;

- **Les acides aminés** (rôles de chélateurs, d'osmolytes, de tampons pH, d'antioxydants, de régulateurs métaboliques, de précurseurs biosynthétiques *etc.*) : ils sont indispensables au bon développement embryonnaire (un milieu sans acides aminés altère le potentiel de développement des embryons). La nature des acides aminés dont l'embryon a besoin diffère en fonction de son stade de développement. Néanmoins, l'ammonium est un toxique produit par le métabolisme de la glutamine, qui a donc été remplacée par des dipeptides stables.

- **Les chélateurs** : l'EDTA a un effet bénéfique mais uniquement au stade clivé puisqu'il inhibe la glycolyse. Après la compaction, la présence d'EDTA provoque une réduction de la MCI et altère le développement fœtal ;

- **Les protéines et macromolécules** (albumine +/- hyaluronane, essentiel dans les milieux de culture).

Il existe deux grandes sortes de milieux de culture, qui diffèrent par leur composition : milieux uniques et milieux séquentiels (Werner et *al.*, 2016).

b. Les milieux séquentiels

Les milieux séquentiels (approche « Back to nature ») contiennent les nutriments spécifiques à chaque stade de développement embryonnaire : ils s'adaptent aux changements métaboliques de l'embryon avant et après sa compaction. L'embryon est donc dans un premier milieu de J0 à J3, puis est changé de milieu au troisième jour pour la suite de sa culture. Ce type de milieu a été développé et validé pour améliorer les issues cliniques et biologiques de la CP (Gardner and Lane, 1997; Gardner et *al.*, 1998b; Jones et *al.*, 1998).

Afin de s'adapter aux besoins physiologiques des embryons, le premier milieu contient essentiellement des acides aminés non essentiels, de l'EDTA, du pyruvate et une faible concentration de glucose, tandis que le deuxième milieu contient des acides aminés essentiels, moins de pyruvate, plus de glucose mais ne contient plus d'EDTA.

c. Les milieux globaux

En revanche, le milieu global (approche « Let the embryo choose ») est utilisé du premier jour de culture (dès la mise en fécondation par FIV ou ICSI) jusqu'à la fin de la culture (J2-3 ou J5-6 en cas de CP). Il contient donc d'emblée tous les nutriments nécessaires à l'embryon quel que soit son stade de développement (Biggers and Racowsky, 2002; Macklon et *al*., 2002). Même si les milieux séquentiels ont montré de très bons taux de succès après leur mise en place pour la CP, le principe du milieu unique a continué de susciter des nombreuses recherches pour être amélioré puisqu'il est plus simple à utiliser en pratique et moins coûteux. Il contient donc tous les ingrédients nécessaires jusqu'au développement du blastocyste : acides aminés essentiels et non essentiels, l'EDTA, le glucose, le pyruvate et le lactate en concentration constante. Ce type de milieu a été amélioré grâce à de nombreuses recherches sur modèles animaux (Lawitts and Biggers, 1991a, 1991b).

d. Quel type de milieu choisir ?

Le principe du milieu unique permet donc à l'embryon de choisir lui-même les nutriments dont il a besoin, tandis que les milieux séquentiels imitent plus étroitement les conditions *in vivo*. De nombreuses études ont montré de meilleurs résultats (ou au moins équivalents) avec les milieux uniques (Biggers and Racowsky, 2002; Macklon et *al.*, 2002), néanmoins, Werner et *al.* ont trouvé des résultats contradictoires avec un moindre taux de blastoformation en milieu unique (*vs.* séquentiels) (Werner et *al.*, 2016). Cependant, ils n'ont pas trouvé de différence pour les taux d'implantation.

Ainsi, il existe de nombreuses études avec des résultats contradictoires, y compris des méta-analyses, et il est difficile de conclure sur la supériorité d'un type de milieu de culture plutôt qu'un autre. En l'absence de consensus à ce jour sur l'utilisation optimale de l'un ou l'autre (Swain et *al.*, 2016), chaque laboratoire est libre de déterminer quel est le milieu de culture le plus adapté à son activité.

B. PARAMETRES INFLUENÇANT LA CULTURE EMBRYONNAIRE

Il a été démontré que de nombreux facteurs tels que la lumière, les variations de température, la composition atmosphérique gazeuse, le pH, l'osmolarité des milieux, la qualité de l'air ainsi que l'accumulation de toxines dans les milieux (en raison de la nature statique de la culture) peuvent influencer les taux de réussite en AMP (taux de fécondation, développement embryonnaire, taux de grossesse) (Higdon et *al.*, 2008; Wale and Gardner, 2016). Ainsi, des conditions sub-optimales peuvent diminuer les taux de succès d'un laboratoire d'AMP (Quinn et *al.*, 1990). Malgré de nouvelles connaissances et améliorations en AMP, les taux de succès stagnent autour de 25 à 30% (Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA), 2013), et cela peut être dû, entre autres, à la sensibilité de l'embryon préimplantatoire à son environnement ainsi qu'à la complexité des processus impliqués dans la fonction endométriale et l'implantation.

Par ailleurs, Wale et Gardner ont décrit une sensibilité différente des embryons en fonction de leur stade de développement (Wale and Gardner, 2016). Ainsi, le zygote serait très sensible à toutes les variations de conditions de culture, bien plus que l'embryon précoce qui l'est lui-même plus que la morula puis le blastocyste qui serait le moins sensible) (*Figure 10*).

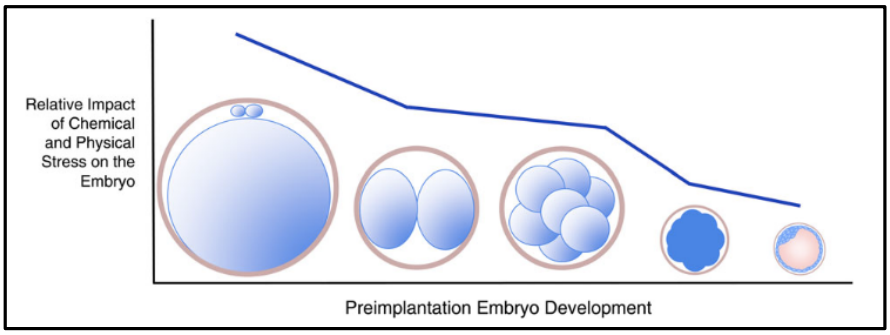


Figure 10 : Impact relatif des facteurs de stress physiques et chimiques sur l'embryon préimplantatoire représentant les différences stade-spécifiques de la réponse de l'embryon au stress (Wale and Gardner, 2016)

C. LE STRESS OXYDATIF

Le métabolisme aérobie présente à la fois des avantages et des effets secondaires potentiellement dommageables pour les systèmes biologiques (Burton and Jauniaux, 2011). Il participe aux transferts d'électrons de haute énergie et soutient donc la production de grandes quantités d'ATP par phosphorylation oxydative. Ceci est nécessaire à l'évolution d'organismes multicellulaires complexes, mais est susceptible d'attaquer n'importe quelle molécule biologique (protéine, lipide, ADN). Par conséquent, notre corps subit l'attaque oxydative constante des espèces réactives de l'oxygène (ROS) : pro-oxydantes. Ces dernières doivent être inactivées par différents mécanismes de protection antioxydants (enzymatiques et non-enzymatiques) (Guérin et *al.*, 2001). Il existe donc, dans les conditions optimales, un équilibre entre pro- et antioxydants permettant le maintien de l'homéostasie intracellulaire. Un déséquilibre en faveur des pro-oxydants (surproduction des ROS) aboutit au stress oxydatif. Les ROS jouent un rôle important en tant que seconds messagers dans de nombreuses cascades de signalisation intracellulaire visant à maintenir la cellule en homéostasie avec son environnement immédiat (Dröge, 2002). Leur synthèse peut être endogène (principalement liée à la phosphorylation oxydative et aux enzymes NADPH et xanthines oxydases), mais il existe également plusieurs facteurs exogènes pouvant augmenter leur production (comme l'hyper/hypoxie, excès de glucose, exposition aux ultraviolets *etc.*) (Guérin et *al.*, 2001).

a. Les espèces réactives oxygénées.

Le terme ROS s'applique à la fois aux radicaux libres et à leurs intermédiaires non radicaux. Les radicaux libres sont définis comme des espèces contenant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui leur confère une grande réactivité. Ils peuvent être générés à partir de nombreux éléments, mais dans les systèmes biologiques, ce sont ceux qui concernent l'oxygène et l'azote qui sont les plus importants. Les 3 principales ROS sont les anions superoxydes (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et les radicaux hydroxyles (OH).

Dans les conditions physiologiques, le radical libre d'oxygène le plus courant est l'anion superoxyde (O_2^-), provenant principalement des mitochondries. Il est détoxifié par les enzymes superoxyde dismutases qui le convertissent en H_2O_2. Ce dernier n'est pas un radical libre et est donc moins réactif, mais fait tout de même parti des ROS car il intervient dans la génération et la désintoxication des radicaux libres. Non polaire, il diffuse plus facilement à travers les membranes cellulaires et agit donc largement comme messager dans les voies de signalisation. Il est à son tour détoxifié en eau (H_2O) par les enzymes catalase et glutathion peroxydase. Il est important que les enzymes antioxydantes agissent de concert, car un déséquilibre entre les ions O_2^- et H_2O_2 peut entraîner la formation d'OH, beaucoup plus dangereux. Celui-ci est très réactif et peut interagir avec n'importe quelle molécule biologique dans son environnement immédiat. La génération excessive de O_2^- peut également conduire à des interactions avec l'oxyde nitrique (NO) pour former du peroxynitrite ($ONOO^-$) qui est un puissant pro-oxydant (*Figure 11*).

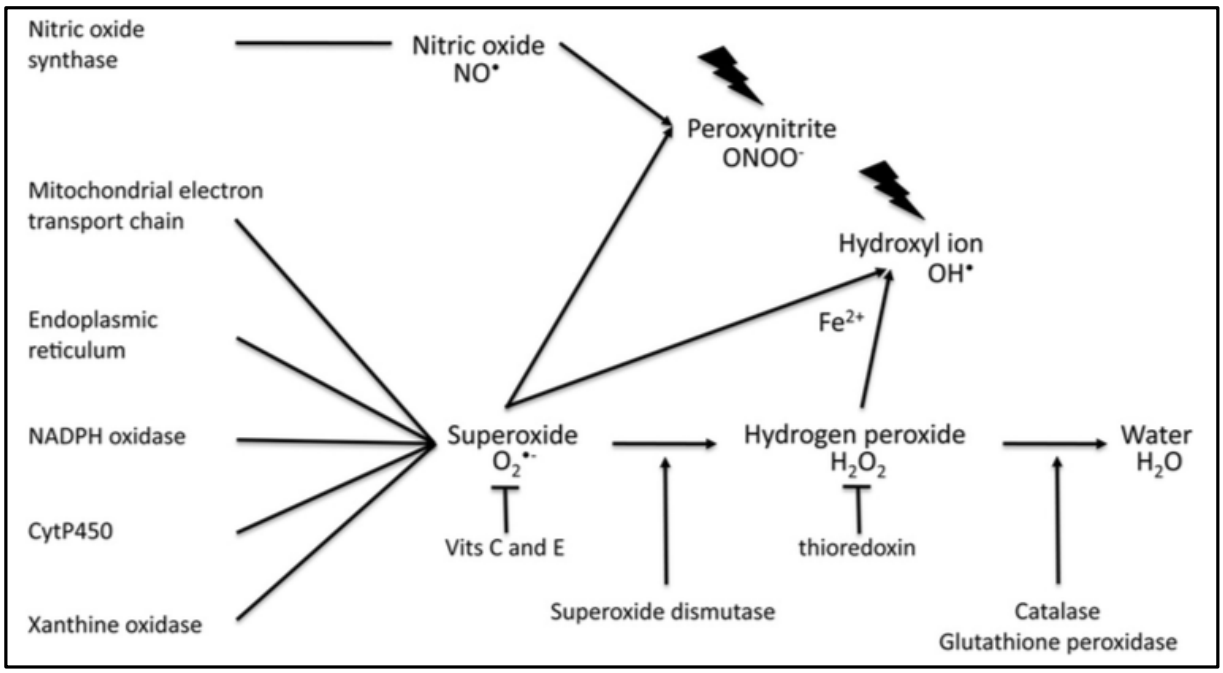


Figure 11 : Les principales ROS, leurs origines potentielles et voies de détoxification (Burton and Jauniaux, 2011)

b. Impact du stress oxydatif

Une augmentation excessive des ROS a été mise en cause dans la pathogénèse de nombreuses maladies (cancer, diabète sucré, athérosclérose, maladies neurodégénératives, polyarthrite rhumatoïde *etc.*) par l'intermédiaire d'un mécanisme de sénescence (Dröge, 2002), mais également dans l'infertilité avec un impact sur la fonction utérine et tubaire, la folliculogénèse, l'ovulation, la fécondation, l'embryogénèse mais également l'implantation (Agarwal et *al.*, 2003; Al-Gubory et *al.*, 2010; Guérin et *al.*, 2001).

Le métabolisme normal de l'embryon génère des ROS (variations selon le stade de développement), et ce, de façon plus importante *in vitro* (augmentation d'H_2O_2 observée *in vitro*) (Burton et *al.*, 2003). En effet, les facteurs exogènes pouvant augmenter la production de ROS sont plus nombreux dans les conditions de culture embryonnaire *in vitro* : excès de glucose, lumière, processus de vitrification *etc.* (Goto et *al.*, 1993; Guérin et *al.*, 2001; Nasr-Esfahani et *al.*, 1990). Ainsi, la culture sous tension atmosphérique en oxygène (20%) pourrait faire partie des éléments susceptibles de générer un stress oxydatif délétère pour le développement embryonnaire.

D. INTERET DE LA CULTURE EN HYPOXIE POUR LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE : ETAT DE LA LITTERATURE

Chez les mammifères (lapin, singe, hamster), l'environnement intra-utérin des embryons est à une faible concentration en oxygène (de l'ordre de 2 à 8%) (Mastroianni and Jones, 1965). Considérant qu'une telle hypoxie physiologique existe également dans le tractus génital féminin humain, une réduction des taux d'oxygène pourrait avoir des implications importantes dans les pratiques en AMP. Or, dans la majorité des laboratoires d'AMP, les incubateurs utilisés pour la culture embryonnaire sont dans des conditions atmosphériques en oxygène, soit environ 20% d'O_2 et 6% de CO_2.

Plusieurs études randomisées chez l'homme ont montré la supériorité en termes de qualité embryonnaire et de blastoformation de la faible concentration en oxygène (5%) *(Guo* et *al.*, 2014; Kasterstein et *al.*, 2013; Kea et *al.*, 2007; Kovacic and Vlaisavljević, 2008; Santos *et al.*, 2013; Waldenström *et al.*, 2009). Ces résultats peuvent s'expliquer par l'environnement plus physiologique probablement dû à une diminution du stress oxydatif, réputé pour avoir un impact négatif sur le développement embryonnaire (Guérin *et al.*, 2001; Wale and Gardner, 2016) et les issues cliniques en AMP (Agarwal et *al.*, 2003; Al-Gubory et *al.*, 2010).

Tenant compte de la plasticité variable de l'embryon à s'adapter à son environnement selon son stade (*cf* plus haut), la question de quand (à quel stade ?) est-il nécessaire d'appliquer une tension basse en oxygène durant la culture *in vitro* est également posée. Les résultats observés dans les études ayant comparé (i) 5%, (ii) 20-5% et (iii) 20% d'O_2 (continue ou taux variable à différents stades durant la culture embryonnaire) montrent une meilleure qualité embryonnaire précoce (Peng et *al.*, 2015), un taux de blastoformation plus élevé et des blastocystes obtenus de meilleure qualité (Ciray et *al.*, 2009) dans les groupes cultivés exclusivement à 5%. Ceci suggère une irréversibilité de l'impact du stress oxydatif agissant avant la compaction.

Wale et Gardner ont étudié cet impact de la concentration en oxygène sur le développement embryonnaire chez la souris en comparant quatre stratégies de culture embryonnaire selon la tension en O_2 (Wale and Gardner, 2010) : (i) groupe 1 : exclusivement à 5% ; (ii) groupe 2 : culture à 5% de J0 à J2 puis passage à 20% de J2 à J4 ; (iii) groupe 3 : 20%

puis passage à 5% à J2 ; (iv) et groupe 4 : culture exclusivement à 20%. Des résultats similaires à ceux des études citées précédemment ont été obtenus en comparant les groupes 1, 3 et 4 avec notamment une amélioration du taux de blastoformation à 5% d'O_2. Néanmoins, aucune différence en termes de blastoformation n'a été rapportée entre les groupes 1 (5%) et 2 (5% puis passage à 20% pour la CP), ce qui laisse supposer que le stress oxydatif induit par une culture à 20% pourrait n'impacter que les stades précoces du développement embryonnaire, et qu'un passage à 20% d'O_2 dès J2-J3 n'influencerait pas la suite du développement. Cette hypothèse n'a encore jamais été étudiée chez l'Homme.

Ces différentes études suggèrent donc qu'il serait préférable que tous les laboratoires d'AMP fonctionnent avec le système « tri-gaz », permettant de réduire la concentration en oxygène dans les incubateurs utilisés pour la culture embryonnaire (5% d'O_2, 6% de CO_2 et 89% de N_2). D'ailleurs, ces modalités sont également recommandées (mais non imposées) depuis peu, en particulier pour les cultures prolongées (*cf.* ESHRE Guidelines 2015). Néanmoins, peu de centres sont équipés de ce type de système, en raison du coût important de ces installations, lié à la consommation en azote et aux prix des matériels. En effet, l'alimentation des incubateurs en azote complique la logistique du laboratoire, impliquant le changement régulier des bouteilles et une surveillance quotidienne de leur niveau de remplissage en l'absence de ligne d'alimentation dédiée. Or, l'étude chez la souris de Wale et Gardner laisse penser que l'on pourrait débuter la culture à faible tension en oxygène, puis, à J2-J3, transférer les boîtes de culture dans un incubateur classique (20% d'O_2 supplémenté de 6% de CO_2) jusqu'au stade blastocyste lorsque la CP est indiquée. Ceci permettrait donc de diminuer à la fois la consommation en azote et le nombre d'incubateurs équipés en tri-gaz, réduisant par conséquent le coût global, tout en optimisant les conditions de culture.

PARTIE 2 : ETUDE

I. OBJECTIFS

L'objectif de notre étude est double :

- Premièrement : Confirmer l'amélioration de la qualité embryonnaire lors d'une culture à tension réduite en oxygène.
- Secondairement : Vérifier chez l'Homme l'hypothèse de *Wale et Gardner*, à savoir que la tension réduite en oxygène pendant la culture *in vitro* étendue au stade blastocyste n'était nécessaire qu'aux seuls stades précoces du développement embryonnaire.

II. MATERIEL & METHODES

Cette étude est en cours au sein du laboratoire de Biologie de la Reproduction du CHU Jean-Verdier (Bondy, 93), depuis janvier 2016. Il s'agit d'une étude prospective, randomisée, ouverte en groupes parallèles, monocentrique, comparant trois conditions de culture :

- Conditions atmosphériques d'O_2 (≈20%) ;
- Tension réduite en O_2 (5%) ;
- Tension réduite durant la culture aux stades précoces du développement embryonnaire puis passage aux conditions atmosphériques durant la CP (5% puis 20% d'O_2).

Ce protocole s'inscrit dans le cadre d'une recherche visant à évaluer les soins courants telle que définie par la loi n°2004-806 du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique et par son décret d'application (n° 2006-477) du 26 avril 2006 (textes de référence : articles L.1121-1, 2^{e} alinéa et R1121-3 du Code de la Santé Publique), et a eu l'accord à l'unanimité des votants du Comité de Protection des Personnes (CPP) Ile-de-France X (n° ID RCB 2015-A02019-40).

A. POPULATION

a. Critères d'inclusion

Les couples éligibles sont pris en charge dans le cadre d'une procédure d'AMP dans les services de Médecine et de Biologie de la Reproduction du CHU Jean Verdier, pour une **tentative de FIV/ICSI** avec **sperme éjaculé du conjoint** (frais ou congelé). Les femmes

doivent avoir **entre 18 et 39 ans inclus**, et bien comprendre le protocole de stimulation. Puis, les couples sont randomisés par tirage au sort, le jour de la ponction, si **au moins 8 complexes cumulo-ovocytaires** (CCO) sont retrouvés dans le liquide folliculaire.

b. Critères de non inclusion

En cas d'absence de sperme utilisable le jour de la ponction (échec de recueil/absence de sperme congelé ou azoospermie le jour du recueil) ou présence d'un hydrosalpinx, les couples ne sont pas inclus dans l'étude.

c. Exclusion

Les tentatives sont exclues en cours d'étude lors de :

- Défaut de suivi du protocole (erreur de randomisation ou d'incubateur) ;
- Absence d'ovocyte mature après décoronisation ;
- Echec total de fécondation observé à J0 (ICSI) ou J1 (FIV).

B. INTERVENTIONS

a. Procédures de FIV/ICSI et culture embryonnaire

Pour chaque tentative randomisée, la patiente a suivi un protocole de stimulation ovarienne pluri-folliculaire afin d'obtenir un grand nombre d'ovocytes matures (fécondables) et donc d'augmenter les chances d'obtenir des embryons à transférer. Les stimulations de l'ovulation sont conduites selon différents protocoles thérapeutiques associant les gonadotrophines (FSH ± LH) aux analogues de la GnRH (agonistes ou antagonistes), parfois précédés par un traitement par oestroprogestatifs, selon les caractéristiques cliniques féminines. Les gonadotrophines stimulent les ovaires pour provoquer la croissance folliculaire et la maturation ovocytaire ; tandis que les analogues de la GnRH permettent de bloquer l'ovulation afin de décider du meilleur timing pour celle-ci.

Un monitorage échographique et hormonal (FSH, LH et estradiol) est réalisé pour évaluer le nombre, la croissance et la stéroïdogénèse des follicules, et décider du jour optimal pour le déclenchement hormonal (par hCG urinaire ou recombinante) de l'ovulation (lorsqu'au moins 3 follicules font plus de 17mm avec un taux d'estradiol en rapport).

La ponction (transvaginale et sous contrôle échographique), est réalisée 36 heures après le déclenchement, sous anesthésie locale ou générale. Les liquides folliculaires sont récupérés

dans des tubes de 15 millilitres préchauffés et confiés directement à l'opérateur biologique par un passe-plat asservi entre la salle de ponction et le laboratoire.

La recherche des CCO se fait dès réception des tubes de liquide folliculaire, sous loupe binoculaire, puis ils sont placés dans du G-Gamète® (Vitrolife) dans des incubateurs, à 37°C, sous 6% de CO_2, en atmosphère humidifiée (tension atmosphérique en O_2) jusqu'à mise en fécondation.

La préparation du sperme (frais ou congelé) se fait le matin de la tentative, selon les recommandations du manuel de l'OMS (*World Health Organization*, 2010). Il est préparé afin de sélectionner un maximum de spermatozoïdes mobiles progressifs rapides et capacités tout en éliminant le plasma séminal et autres composants du sperme (cellules rondes, polynucléaires, *etc.*). Sauf exception, la préparation est réalisée par migration sur gradient de densité 2 couches (PureSperm®, Nidacon International) et reprise du culot dans du G-Gamète® (Vitrolife). Les spermatozoïdes ainsi sélectionnés sont utilisés pour la mise en fécondation des ovocytes, par fécondation *in vitro* (FIVc) ou micro-injection de spermatozoïdes (ICSI), en fonction des paramètres spermatiques initiaux et des résultats d'éventuelles tentatives précédentes du couple.

En cas de FIVc, les ovocytes sont répartis, quelques heures après la ponction, un par un, dans des microgouttes de 50 µL de CSC® (Irvine Scientific), sous huile Ovoil® (Vitrolife) et inséminés par 10 000 à 15 000 spermatozoïdes mobiles par ovocyte.

Les ovocytes destinés à une FIV avec ICSI sont décoronisés, après recueil, par décoronisation chimique (hyaluronidase : Fertipro) et mécanique, permettant d'isoler les ovocytes de leurs cellules folliculaires. La micro-injection de chacun des ovocytes fécondables (avec présence d'un globule polaire = métaphase 2) est réalisée dans une microgoutte de FertiCult HEPES® (FertiPro) avec un spermatozoïde mobile et morphologiquement normal, après capture et immobilisation dans une solution de polyvinylpyrrolidone (PVP, Vitrolife) par cisaillement du flagelle. Les ovocytes injectés sont ensuite transférés dans des microgouttes de 50 µL de CSC® (Irvine Scientific) préalablement équilibrées sous huile Ovoil® (Vitrolife).

En fonction de la randomisation (*cf.* ci-après), les boîtes de culture contenant les ovocytes inséminés ou injectés sont placées dans des incubateurs à chambres individuelles (K System G185 et G210 – Origio) (*Figure 12*) ; l'un étant gazé à 20% d'O_2 et 6% de CO_2, tandis que, l'autre est équipé d'un système tri-gaz (89% de N_2, 6% de CO_2 et 5% d'O_2).



Figure 12 : Incubateur K System G-210 - Origio

L'évaluation de la qualité morphologique des embryons s'effectue en double lecture, de J1 à J5 ±J6 sous microscope inversé par des opérateurs habilités selon le système de management de la qualité en vigueur au laboratoire. En cas de FIVc, les ovocytes sont décoronisés à J1 par décoronisation mécanique afin d'enlever les cellules folliculaires pour pouvoir observer les ovocytes, leur fécondation puis le développement embryonnaire dans les jours suivants. Dans les deux cas (FIVc et ICSI), à J1, la fécondation est confirmée en présence de 2 PN et 2 globules polaires. Les éventuelles anomalies de fécondation (1 PN en ICSI, >2 PN ou atrésie) sont repérées et les ovocytes sont éliminés.

En cas de transfert frais, celui-ci a lieu à J2 ou J3 si entre 1 et 4 embryons de bonne qualité sont disponibles. Dans les cas où au moins 5 embryons de bonne qualité à J2 et J3 sont observés, la CP est proposée au couple. Le nombre d'embryons transférés est décidé conjointement entre gynécologues et biologistes en fonction du nombre et de la morphologie des embryons disponibles, ainsi que des données cliniques du couple. Les embryons surnuméraires de bonne qualité considérés « utiles » sont vitrifiés, afin d'être transférés sur un cycle ultérieur après préparation de l'endomètre (cycle naturel modifié ou stimulé, traitement hormonal substitutif). Il en est de même pour l'ensemble des embryons utiles en cas d'impossibilité de transfert frais.

b. RANDOMISATION

La randomisation est réalisée à J0, juste après la lecture de la ponction, selon le compte de CCO retrouvés, après vérification des critères d'inclusion. Cette première randomisation se fait selon un ratio 2 pour 1 : 1 patiente incluse dans le groupe à 20% d'O_2 (groupe A) pour 2 patientes incluses dans le groupe à 5% (groupe B).

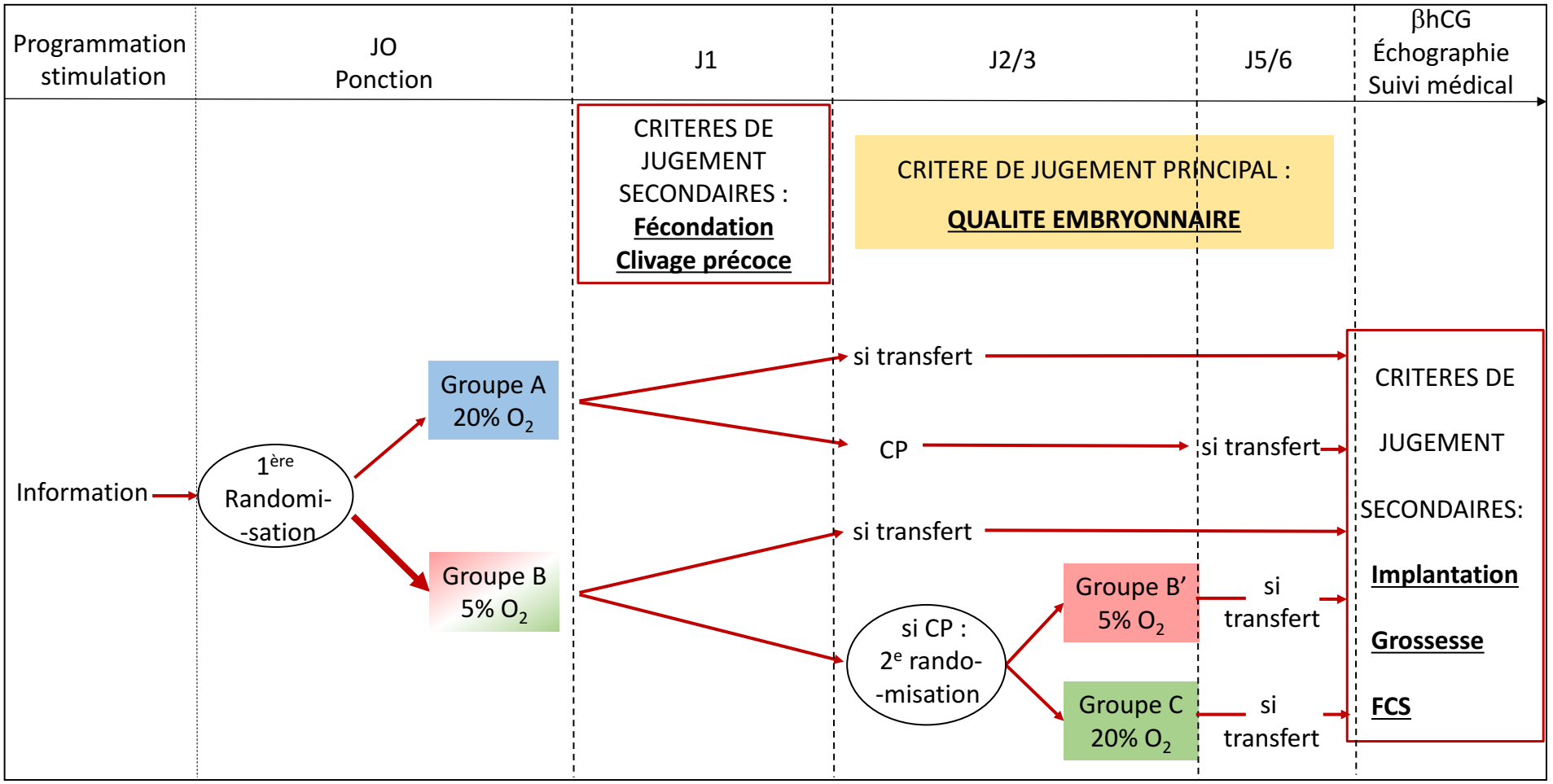
Si une CP est indiquée (décision prise à J2/3) en présence d'au moins 5 embryons de bonne qualité), une deuxième randomisation a lieu uniquement dans le groupe B (selon un ratio 1 pour 1), afin de diriger la suite de la culture embryonnaire vers 5 ou 20% d'O_2 de J2/3 à J5/6.

Les couples sont donc randomisés dans 2 groupes (A ou B) jusqu'à J3 puis 3 groupes (A, B', C) si la culture s'étend jusqu'à J5/6, soit (*Figure 13*) :

- **Groupe A** : culture exclusivement à **20%** d'O_2 (conditions atmosphériques d'oxygène) ;
- **Groupe B/B' (si CP)** : culture exclusivement à **5%** d'O_2 ;
- **Groupe C** : culture à **5%** jusqu'à J2/3 **puis à 20%** d'O_2 en cas de décision de CP.

Le but du tirage au sort est d'assurer la comparabilité entre les 3 groupes. La randomisation est effectuée par l'ouverture d'une enveloppe préalablement scellée. L'ordre d'attribution est établi selon un tirage au sort par la technique des blocs.

Figure 13 : Schéma de l'étude



C. EVALUATION DES DONNEES

a. Critère d'évaluation principal

Le critère d'évaluation principal est la **qualité morphologique embryonnaire** (*Figure 13*), comparée :

- Dans un premier temps, entre les 2 groupes initiaux (A *vs.* B), parmi la population totale de l'étude (**qualité embryonnaire comparée aux stades précoces à J1, J2 et J3**)
- Dans un deuxième temps, entre les 3 groupes (A *vs.* B' *vs.* C) ayant eu une CP (**qualité embryonnaire comparés aux stades blastocystes J5 ± J6**).

A J2 et J3, la qualité embryonnaire est étudiée selon les critères suivants :

- Nombre de blastomères ;
- Taux de fragmentation cytoplasmique ;
- Symétrie des divisions cellulaires ;
- Présence de multinucléation(s)

Un embryon dit de TOP qualité à J2 doit avoir un taux de fragmentation cytoplasmique inférieur ou égal à 20% et 4 blastomères (A4 ou B4), tandis qu'un embryon de bonne qualité doit avoir de 3 à 5 blastomères pour le même taux de fragmentation (A ou B, de 3 à 5 cellules). Ils doivent également présenter des divisions cellulaires symétriques et l'absence de multinucléation.

A J3, les critères pour un embryon de TOP ou bonne qualité sont les mêmes qu'à J2 pour la fragmentation, la symétrie et la multinucléation, mais ils doivent avoir 8 (embryon TOP) ou 7 à 9 cellules (embryon de bonne qualité) respectivement (A/B8 ou A/B de 7 à 9 cellules).

Tandis qu'à J5/6, la qualité des blastocystes est reportée selon la classification de Gardner et Schoolcraft (Gardner and Schoolcraft, 1999) (*Figure 8*).

Nous considérons dans notre étude, qu'un blastocyste de TOP qualité doit au moins être de type ≥ B4BB ; tandis qu'un blastocyste de bonne qualité doit être de grade ≥ B3BB.

Les nombres (et taux si besoin) d'embryons respectivement de TOP et bonne qualité à J2, J3 (par embryon si taux), puis le nombre de blastocystes totaux ou de TOP/bonne qualité J5 ± J6 par blastocyste obtenu ou par embryon J2 ont été colligés puis comparés entre les différents groupes de l'étude.

b. Critères d'évaluation secondaires

Les critères d'évaluation secondaires sont les suivants (*Figure 13*) :

Les issues biologiques :

- Taux de fécondation diploïde : nombre de zygotes à 2 PN à J1 divisé par le nombre d'ovocytes en métaphase 2 ;
- Taux de clivage précoce : nombre d'embryons clivés à la 25^{e} heure post-insémination divisé par le nombre d'ovocytes fécondés à 2 PN à J1 ;
- Taux de blastoformation : nombre de blastocystes à J5/6 divisé par le nombre total d'embryons à J2 ;
- Embryons utiles (congelés ou transférés) :
  - ✓ Nombre d'embryons utiles par tentative
  - ✓ Taux d'embryons utiles : nombre d'embryons utiles divisé par le nombre total d'embryons à J2
  - ✓ Nombre d'embryons transférés ;
  - ✓ Nombre d'embryons congelés par tentative ;

Les issues cliniques :

- Taux d'implantation : nombre de sac(s) gestationnel(s) intra-utérin(s) avec activité cardiaque divisé par le nombre d'embryons transférés ;
- Taux de grossesse clinique (présence d'au moins un sac gestationnel avec activité cardiaque confirmée à l'échographie), par transfert ;
- Taux de fausse couche spontanée.

Comme le critère principal, ces critères de jugement secondaires sont comparés dans un premier temps entre les groupes A *vs.* B (pour la fécondation, le clivage précoce et les issues cliniques) ; puis dans les 3 groupes (A *vs.* B' *vs.* C) (tous les critères secondaires).

D. ANALYSES STATISTIQUES

a. Taille d'échantillon

Nous avons basé notre calcul de taille d'échantillon nécessaire sur l'étude des 3 groupes de CP (groupes A *vs.* B' *vs.* C) car ils nécessitent le plus grand nombre d'inclusions, ce qui permettra donc également de conclure avec une puissance suffisante entre les 2 groupes (A *vs.* B) de culture précoce.

Sachant qu'une différence de 5% du taux de blastocyste de bonne qualité (par embryon clivé J2) a été montrée par Ciray et *al.* (Ciray et *al.*, 2009) entre les cultures à faible concentration en oxygène (16%) ou à condition atmosphérique d'oxygène (11%), la taille de l'échantillon nécessaire pour conclure selon une hypothèse bilatérale, au risque alpha de 5% et pour une puissance de 90%, est de 2 085 blastocystes au total (695 par bras). Sachant que le nombre moyen de blastocystes obtenus chez les femmes de moins de 40 ans ayant au moins 8 ovocytes recueillis dans notre centre est de 3,5 (données personnelles non montrées), en théorie 596 tentatives d'AMP au total devront être incluses en CP pour conclure. Intégrant une majoration de 10% de ce nombre, 656 tentatives théoriques devront être incluses pendant la période d'étude. Cependant, seul le nombre de blastocystes (695) dans chaque groupe clôturera l'étude, lorsqu'atteint.

b. Statistiques

Les données quantitatives ou variables continues ont été exprimées en moyenne (déviation standard) et comparées par une analyse univariée de Student ; tandis que les données qualitatives ou variables nominales, exprimées en pourcentage (nombre), ont été comparées par un test de Chi 2. Le seuil de significativité est de 5%.

E. SUIVI

En cas de transfert embryonnaire, un dosage sanguin des βhCG est réalisé dès 14 jours post-ponction, puis un suivi régulier débutant par une échographie à 4 semaines post-transfert en cas de positivité afin de caractériser la grossesse en cours

III. RESULTATS

A. DESCRIPTION DES INCLUSIONS

Nous présentons ici les résultats intermédiaires des inclusions réalisées entre le 1er janvier 2016 et le 17 décembre 2017. Au total, 722 tentatives ont été incluses (*Figure 14*). Parmi ces tentatives, 250 ont été randomisées dans le groupe A (20% d'O_2), mais seulement 241 ont été analysées, après l'exclusion de 9 tentatives. Parmi ces 241 tentatives, 84 ont bénéficié d'une CP, dont 1 a été exclue de l'analyse. Par ailleurs, 472 tentatives ont été randomisées dans le groupe à 5% d'O_2 (B) pour la culture précoce (dont seulement 450 ont pu être analysées après l'exclusion de 22 tentatives). Parmi ces 450 tentatives analysées, 185 présentaient les critères

permettant de poursuivre en CP, mais 10 ont été exclues. Ainsi, 88 ont été randomisées à J3 dans le groupe B' (CP à 5% d'O_2) et 87 dans le groupe C (CP à 20% d'O_2).

Les raisons d'exclusion étaient des défauts de suivi de protocole, avec :

- Erreur de randomisation
  - ✓ Age de la femme > 39 ans
  - ✓ Utilisation de spermatozoïdes non éjaculés du conjoint (issus de biopsie testiculaire ou sperme de donneur)
  - ✓ Oubli de randomisation à J3 pour le groupe B si CP décidée
  - ✓ CP dans les groupes A ou B en l'absence des critères embryonnaires décrits précédemment

- Critères d'exclusion :
  - ✓ Erreur d'incubateur donc de conditions de gazage
  - ✓ Absence d'ovocytes matures
  - ✓ Echec de fécondation

Parmi les tentatives analysées en CP, nous avons obtenus 659 blastocystes dans le groupe A, 706 blastocystes dans le groupe B' et 762 dans le groupe C (*Figure 14)*.

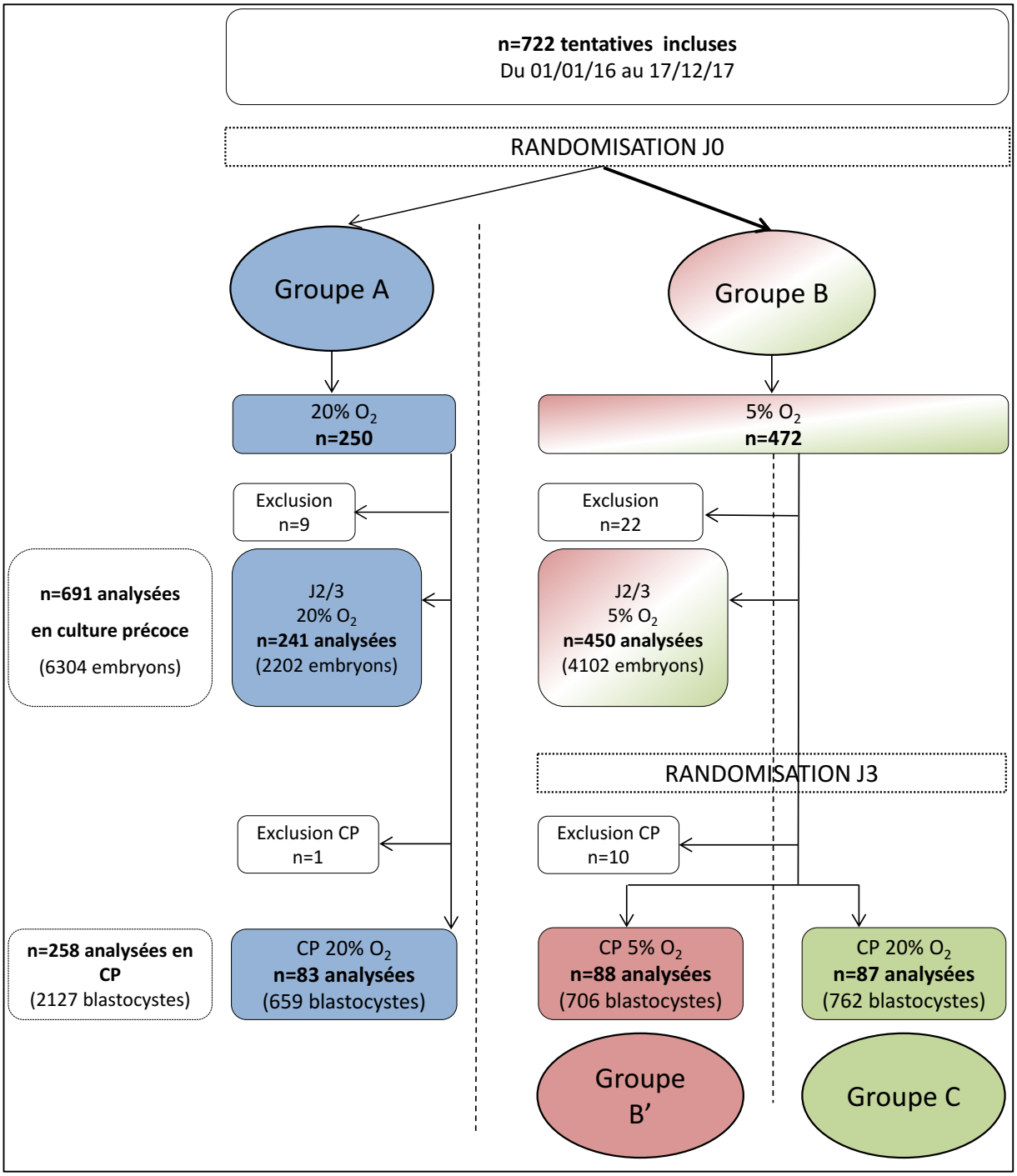


Figure 14 : Flow chart de l'étude

B. ETUDE DES DEUX GROUPES DE CULTURE EMBRYONNAIRE PRECOCE (20% *vs.* 5%)

a. Population

Aucune différence n'a été mise en évidence entre les 2 groupes de culture précoce A et B (5% *vs.* 20%) en ce qui concerne les caractéristiques démographiques des patients (*Tableau 1*). Néanmoins, concernant les caractéristiques cliniques, certaines présentent une différence significative en faveur du groupe cultivé à 5% : nombre de couples avec une indication masculine (44,0 *vs.* 35,7% ; p=0,034), et les doses totales reçues de gonadotrophines (2566 *vs.* 2328 UI ; p=0,013).

Par ailleurs, un plus grand nombre de couples présentant une infertilité idiopathique étaient randomisés dans le groupe à 20% (29,5 *vs.* 20,7% ; p=0,010).

Tableau 1 : Caractéristiques démographiques et cliniques de la population totale de l'étude (20% vs. 5%)

Groupes (n=691 tentatives analysées)	**20% (A) (n=241)**	**5% (B) (n=450)**
Age femme (années) (n=691)	32,9 (4,0)	32,9 (4,3)
IMC femme (kg/m^2) (n=656)	24,5 (4,3)	24,6 (4,2)
Age conjoint (années)	36,3 (6,1)	36,8 (6,6)
Rang de tentative (n=691)	1,4 (0,8)	1,6 (0,9)
Durée infertilité (années) (n=678)	4,4 (2,2)	4,6 (2,6)
Bilan J3		
FSH (UI/L) (n=551)	6,7 (2,1)	6,6 (2,2)
LH (UI/L)	5,6 (3,0)	6,0 (3,5)
AMH (ng/mL) (n=601)	4,1 (3,1)	4,2 (5,1)
Indication		
Masculine	**35,7 (86)**	**44,0 (198)***
Féminine	45,6 (110)	49,1 (221)
Idiopathique	**29,5 (71)**	**20,7 (93)***
Statut ovulatoire		
Ovulatoire	86,9 (205)	84,5 (366)
Dysovulatoire	13,1 (31)	15,5 (67)
Protocole de stimulation		
Agoniste	10,8 (26)	15,6 (70)
Antagoniste	89,2 (215)	84,4 (380)
Durée de stimulation (jours)	10,6 (1,9)	10,8 (1,9)
Dose totale de Gn (UI)	**2328,0 (1108,0)**	**2566,3 (1232,3)***
Bilan jour du déclenchement		
LH (UI/L)	1,3 (1,6)	1,6 (2,7)
Œstradiol (pg/mL)	2544,7 (1408,5)	2446,9 (1259,4)
Progestérone (ng/mL)	0,98 (0,63)	0,97 (0,82)
Epaisseur endométriale (mm) (n=679)	10,3 (2,4)	10,7 (2,6)
Technique		
FIV	56,0 (135)	51,8 (233)
ICSI	44,0 (106)	48,2 (217)

Les données sont présentées en (i) moyenne (Déviation Standard) (m (DS)) ou (ii) pourcentage (nombre) (% (n))
** p<0,05*

b. Qualité embryonnaire précoce

Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les 2 groupes concernant la qualité embryonnaire (J2 et J3). Une tendance non significative en faveur du groupe B était présente pour le nombre d'embryons TOP qualité J2 avec 3,7 *vs.* 3,3 dans le groupe A (p=0,089) (*Tableau 2, Figures 15 et 16*).

Tableau 2 : Issues biologiques précoces de toutes les tentatives de l'étude (A vs. B)

Groupes (n=691 tentatives analysées)	**20% (A) (n=241)**	**5% (B) (n=450)**
Nombre d'ovocytes recueillis	15,5 (7,2)	15,0 (6,2)
Nombre de métaphase 2	12,1 (5,6)	12,0 (5,6)
J1		
Nombre d'ovocytes fécondés à 2PN	8,4 (4,8)	8,3 (4,7)
Taux de fécondation diploïde	69,0 (20,5)	68,7 (20,0)
Nombre d'embryons clivés à H25 (n=519)	**2,4 (2,8)**	**3,3 (3,2)***
Taux de clivage précoce (n=519)	**26,4 (26,9)**	**38,2 (30,2)****
J2 (n=690)		
Nombre d'embryons TOP qualité	3,3 (2,7)	3,7 (3,1)
Taux d'embryon TOP qualité	37,0 (25,0)	40,8 (25,6)
Nombre d'embryons bonne qualité	4,9 (3,5)	5,3 (3,9)
Taux d'embryon bonne qualité	54,1 (26,6)	57,6 (27,2)
J3 (n=503)		
Nombre d'embryons TOP qualité	1,7 (1,7)	1,7 (1,5)
Taux d'embryon TOP qualité	20,1 (19,6)	21,7 (18,5)
Nombre d'embryons bonne qualité	2,9 (2,3)	2,8 (2,0)
Taux d'embryon bonne qualité	34,1 (25,2)	35,0 (23,0)
Nombre d'embryons total	9,1 (5,0)	9,1 (5,0)

Les données sont présentées en (i) moyenne (Déviation Standard) (m (DS)) ou (ii) pourcentage (nombre) (% (n))
** p<0,001 ; ** p<0,0001*

Figure 15 : Qualité embryonnaire à J2 (A vs. B)

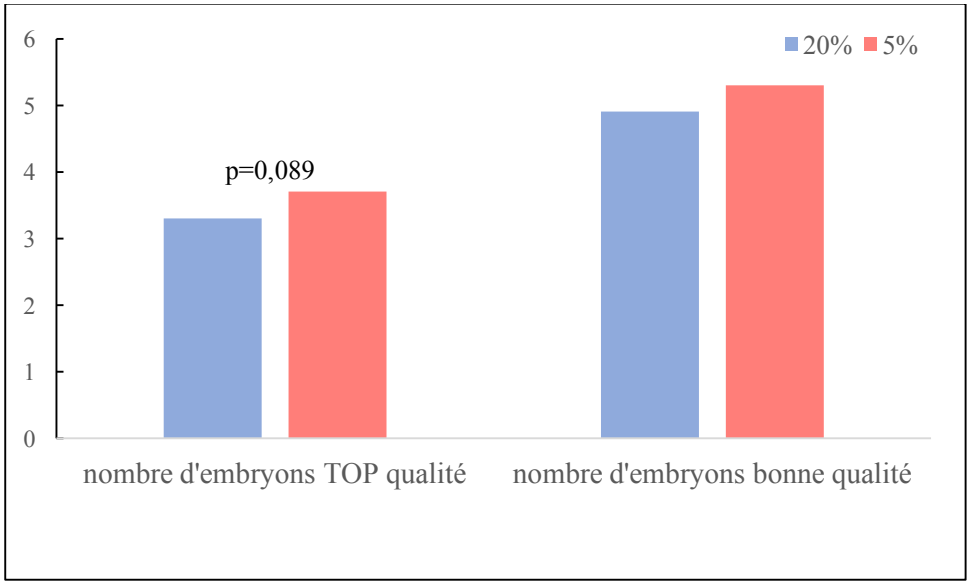
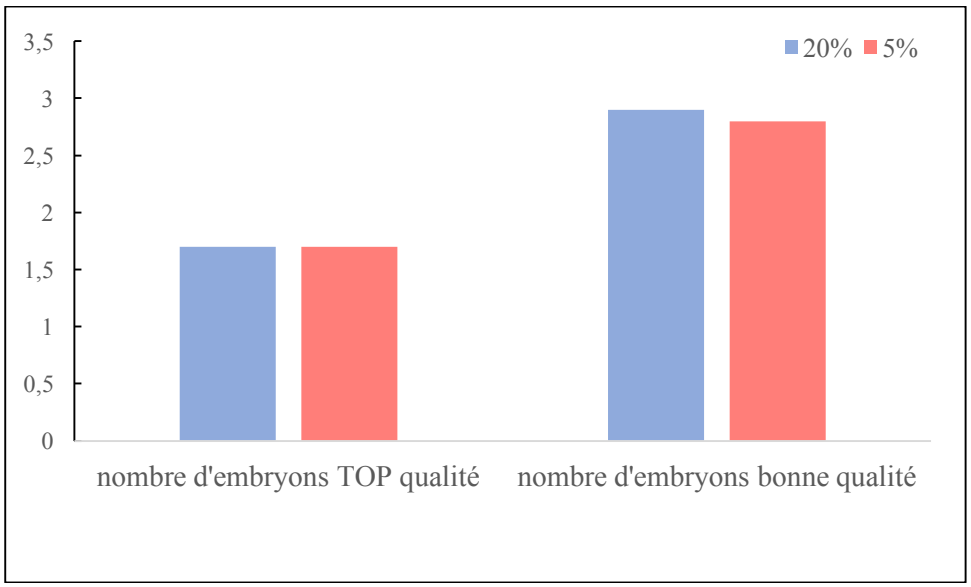


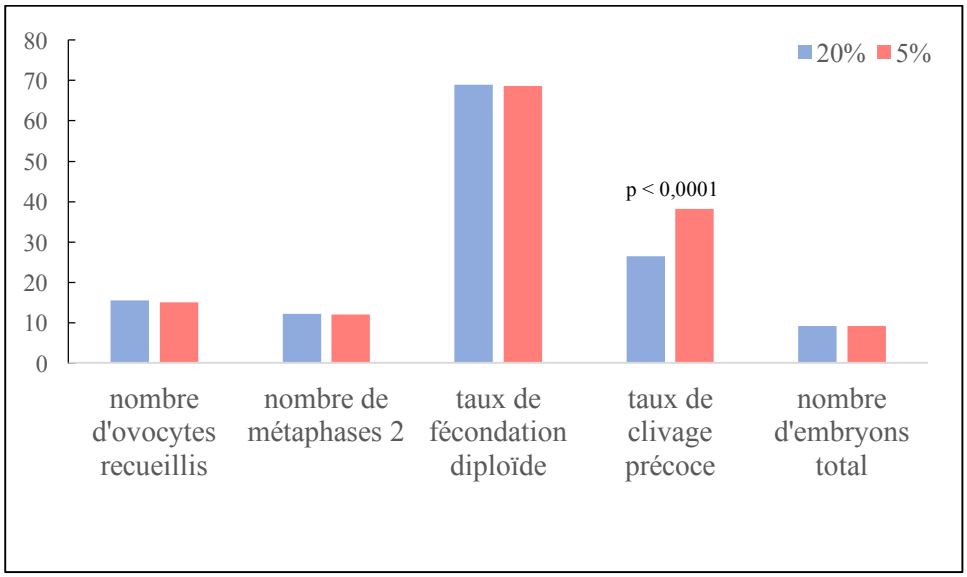
Figure 16 : Qualité embryonnaire à J3 (A vs. B)



c. Critères de jugement secondaires biologiques

Parmi les 691 tentatives analysées en culture précoce, aucune différence n'a été observée en termes de nombre d'ovocytes recueillis, de nombre de métaphases 2, de taux de fécondation diploïde, ni de nombre d'embryons total. Le taux de clivage précoce était significativement plus important dans le groupe B (38,2 *vs.* 26,4% ; p < 0,0001) (*Tableau 2 et Figure 17*).

Figure 17 : Critères de jugement secondaires précoces (A vs. B)



d. Issues cliniques

Concernant les issues cliniques, aucune différence n'a été montrée dans cette partie de l'étude entre les groupes à 20% et 5% d'O_2, parmi les 493 tentatives avec un transfert frais (*Tableau 3*).

Tableau 3 : Issues cliniques de toutes les tentatives de l'étude (20% vs. 5%)

Groupes (n=493 tentatives avec transfert)	**20% (A)** (n=174)	**5% (B)** (n=319)	**p**
Taux d'implantation (n=487)	27,8 (38,1)	29,7 (41,9)	NS
Taux de grossesse clinique	39,7 (69)	37,0 (118)	NS
FCS (n=148)	21,8 (12)	30,1 (28)	NS

Les données sont présentées en (i) moyenne (Déviation Standard) (m (DS)) ou (ii) pourcentage (nombre) (% (n))
NS : non significatif

C. ETUDE DES TROIS GROUPES AVEC CP (A *vs.* B' *vs.* C)

a. Population

Concernant les 258 tentatives analysées ayant bénéficié d'une CP, les caractéristiques démographiques et cliniques des patientes n'ont pas montré de différence significative entre les 3 groupes, excepté, l'âge des hommes plus élevé dans le groupe C (5-20%) par rapport au groupe A (20%) [37,8 *vs.* 35,7 ans; p<0,05], et la dose de gonadotrophines administrées plus faible dans le groupe A *vs.* B et C (*Tableau 4*).

Tableau 4 : Caractéristiques démographiques et cliniques de la population des 3 groupes de CP

Groupes (n=258 tentatives analysées)	**20% (A) (n=83)**	**5% (B') (n=88)**	**5%-20% (C) (n=87)**
Age femme (années)	32,7 (3,7)	32,4 (4,3)	33,5 (4,5)
IMC femme (kg/m^2)	24,6 (4,3)	25,2 (4,4)	25,2 (4,6)
Age conjoint (années)	**35,7 (6,2)***	36,0 (6,6)	**37,8 (7,2)***
Rang de tentative	1,3 (0,6)	1,4 (0,8)	1,4 (0,8)
Durée infertilité (années)	4,5 (2,3)	4,8 (2,9)	4,3 (2,5)
Bilan J3			
FSH (UI/L)	6,1 (2,0)	6,1 (1,5)	6,0 (1,8)
LH (UI/L)	5,5 (3,2)	5,7 (3,4)	6,7 (4,9)
AMH (ng/mL)	4,9 (3,4)	4,9 (4,7)	5,4 (7,0)
Indication			
Masculine	26,5 (22)	36,4 (32)	32,2 (28)
Féminine	63,9 (53)	48,9 (43)	60,9 (53)
Idiopathique	19,3 (16)	22,7 (20)	16,1 (14)
Statut ovulatoire			
Ovulatoire	75,6 (62)	81,2 (69)	73,8 (59)
Dysovulatoire	23,4 (20)	18,8 (16)	26,3 (21)
Protocole de stimulation			
Agoniste	8,4 (7)	12,5 (11)	9,2 (8)
Antagoniste	91,6 (76)	87,5 (77)	90,8 (79)
Durée de stimulation (jours)	10,6 (1,8)	10,7 (1,9)	11,1 (2,2)
Dose totale de Gn (UI)	**1977,3 (820,6)*/****	**2334,4 (1070,7)****	**2345,7 (1304,8)***
Bilan jour du déclenchement			
LH (UI/L)	1,4 (1,5)	1,3 (1,4)	1,4 (1,8)
Œstradiol (pg/mL)	2808,4 (1763,1)	2561,9 (1227,9)	2734,4 (1452,7)
Progestérone (ng/mL)	0,9 (0,7)	0,9 (0,5)	0,8 (0,6)
Epaisseur endométriale (mm)	10,3 (2,4)	10,6 (2,4)	11,0 (2,4)
Technique			
FIV	68,7 (57)	60,2 (53)	58,6 (51)
ICSI	31,3 (26)	39,8 (35)	41,4 (36)

Les données sont présentées en (i) moyenne (Déviation Standard) (m (DS)) ou (ii) pourcentage (nombre) (% (n))
** p<0.05 entre les groupes A et C (20% vs 5%-20%)*
*** p<0.05 entre les groupes A et B' (5% vs 5%-20%)*

b. Qualité embryonnaire

Une différence statistiquement significative a été observée entre les groupes A et B' pour (*Tableau 5, Figures 18, 19*) :

- Le nombre de blastocystes TOP qualité à J5 (1,9 *vs.* 2,7 ; p < 0,05)
- Le nombre de blastocystes TOP qualité à J5+J6 (2,1 *vs.* 3,0 ; p < 0,05)

De plus, une différence a également été observée entre les groupes A et C pour :

- Le nombre de blastocystes TOP qualité à J5 (1,9 *vs.* 2,6 ; p < 0,05)
- Le nombre de blastocystes bonne qualité à J5 (2,8 *vs.* 3,5 ; p < 0,05)
- Le nombre de blastocystes TOP qualité à J5+J6 (2,1 *vs.* 3,0 ; p < 0,05)

Par ailleurs, une tendance non significative (p [0,05-0,07]) a été observée, d'une part entre les groupes A et B' pour :

- Le nombre de blastocystes bonne qualité à J5 (p 0,068) ;
- Le nombre de blastocystes bonne qualité à J5+J6 (p 0,057) ;

Et d'autre part entre les groupes A et C pour :

- Le nombre de blastocystes bonne qualité à J5+J6 (p 0,054).

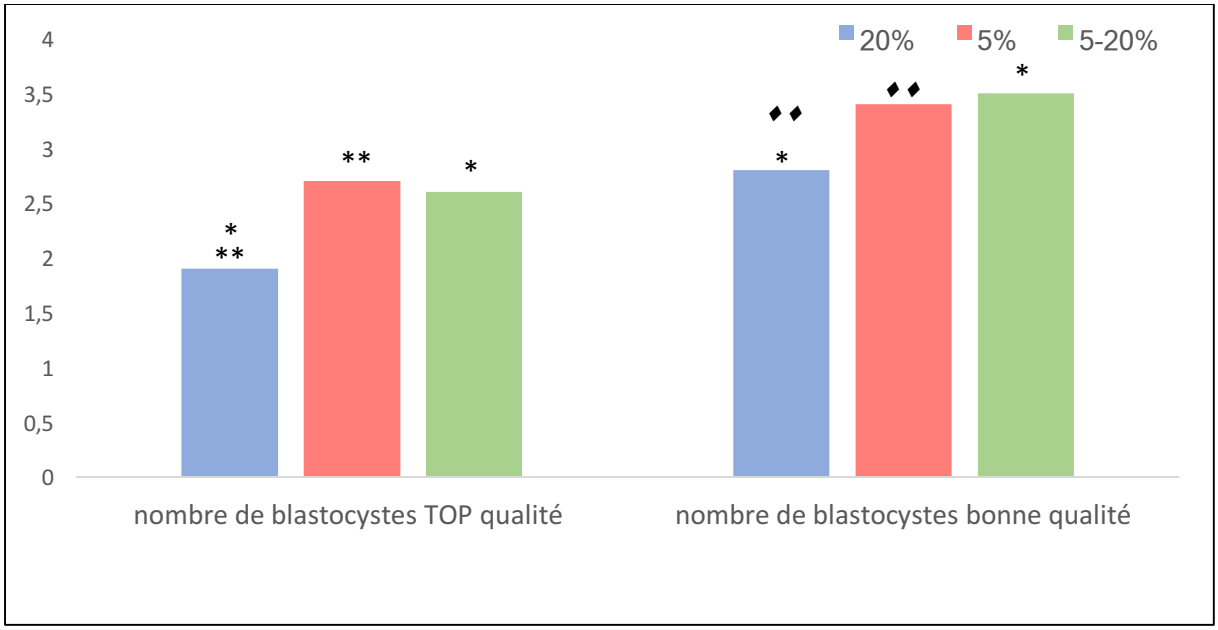
Aucune différence n'a été mise en évidence entre les groupes B' et C pour la qualité embryonnaire à J5 et J6.

Tableau 5 : Issues biologiques des tentatives parmi les 3 groupes de CP

Groupes (n=258 tentatives analysées)	**20%(A) (n= 83)**	**5% (B') (n=88)**	**5%-20% (C) (n=87)**
Nombre d'embryons total	12,1 (5,2)	11,5 (4,8)	12,6 (6,2)
Nombre de blastocystes	7,9 (3,3)	8,0 (3,9)	8,8 (4,3)
Taux de blastoformation	68,1 (19,0)	70,4 (21,3)	71,6 (18,2)
J5 (n=258)			
Nombre de blastocystes TOP qualité	**1,9 (1,5)*/****	**2,7 (2,1)****	**2,6 (2,2)***
Nombre de blastocystes bonne qualité	**2,8 (1,8)*/♦♦**	3,4 (2,2) ♦♦	**3,5 (2,4)***
J5+J6			
Nombre de blastocystes TOP qualité	**2,1 (1,7)*/****	**3,0 (2,1)****	**3,0 (2,4)***
Nombre de blastocystes bonne qualité	3,2 (1,9) ♦/♦♦	3,8 (2,3) ♦♦	3,9 (2,5) ♦
Embryons utiles			
Nombre d'embryons utiles	5,7 (2,5)	5,9 (2,9)	6,2 (3,1)
Taux d'embryon utile/embryons	50,5 (20,6)	53,5 (21,3)	51,9 (20,2)
Nombre d'embryons transférés	0,9 (0,8)	1,1 (0,8)	1,0 (0,9)
Nombre d'embryons congelés	4,8 (2,8)	4,8 (3,3)	5,2 (3,5)

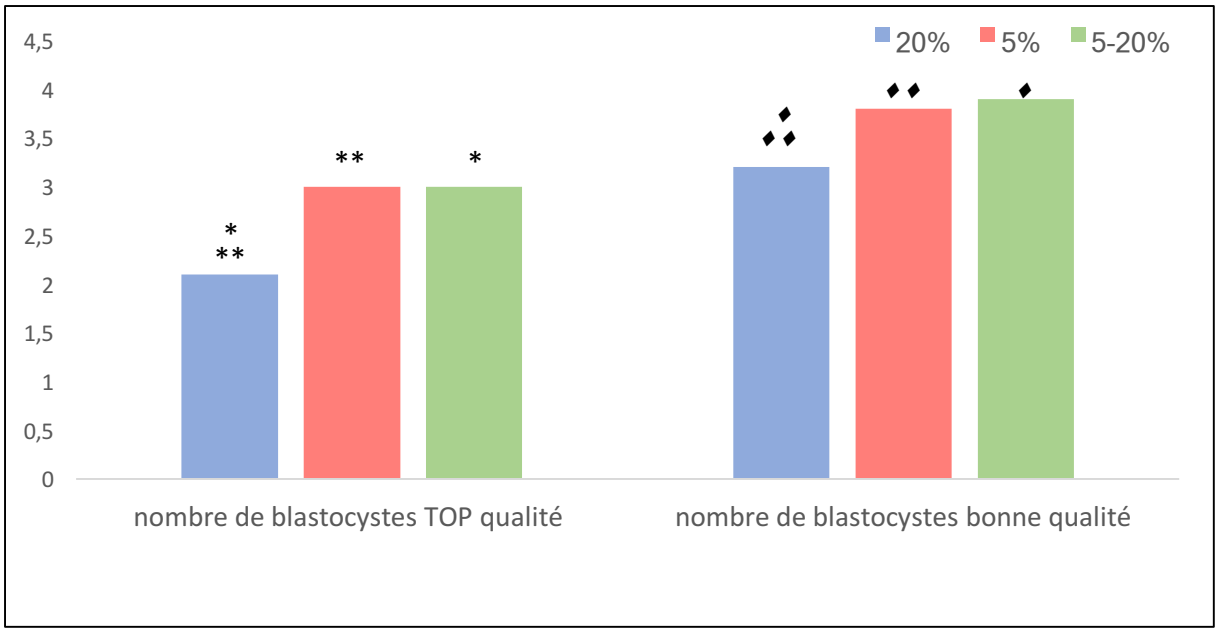
Les données sont présentées en (i) moyenne (Déviation Standard) (m (DS)) ou (ii) pourcentage (nombre) (% (n))
**** p<0.05 entre les groupes A et C (20% vs 5%-20%)** / ♦ tendance non significative entre les groupes A et C*
***** p<0.05 entre les groupes A et B' (5% vs 5%-20%)** / ♦♦ tendance non significative entre les groupes A et B'*

Figure 18 : Qualité embryonnaire à J5 (A vs. B' vs. C)



**** p<0.05 entre les groupes A et C (20% vs 5%-20%)***
***** p<0.05 entre les groupes A et B' (20% vs 5%) / ♦♦ tendance non significative entre les groupes A et B'***

Figure 19 : Qualité embryonnaire J5+J6 (A vs. B' vs. C)

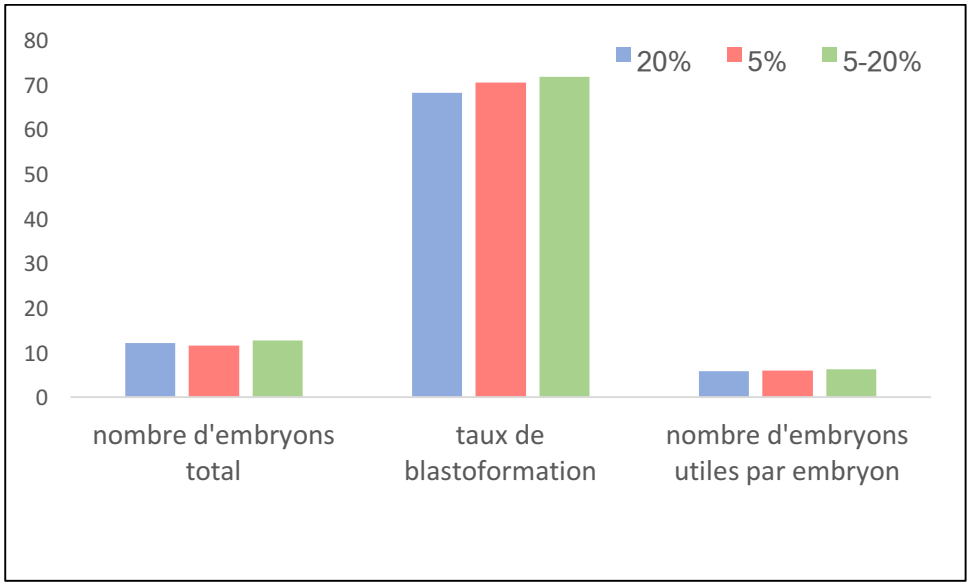


**** p<0.05 entre les groupes A et C (20% vs 5%-20%)*** */ ♦ tendance non significative entre les groupes A et C*
***** p<0.05 entre les groupes A et B' (20% vs 5%)*** */ ♦♦ tendance non significative entre les groupes A et B'*

c. Critères de jugement secondaires biologiques

Aucune différence n'a été observée entre les 3 groupes pour : le nombre d'embryons total ; le nombre de blastocystes total ; le taux de blastoformation ; le nombre d'embryons utiles (congelés et transférés) (*Tableau 5, Figures 20*).

Figure 20 : Critères de jugement secondaires (A vs. B' vs. C)



d. Issues cliniques

Aucune différence significative n'a été observée entre les 3 groupes pour les issues cliniques parmi les 176 patientes ayant eu un transfert frais de blastocyste (*Tableau 6*).

Tableau 6 : Issues cliniques des tentatives parmi les 3 groupes de CP

Groupes (n=176 tentatives avec transfert)	**20%** (n=53)	**5%** (n=68)	**5%-20%** (n=55)
Taux d'implantation (n=174)	43,4 (45,0)	39,4 (46,8)	42,7 (50,4)
Taux de grossesse clinique	52,8 (28)	42,6 (29)	47,3 (26)
Taux de FCS (n=62)	32,0 (8)	30,0 (6)	23,5 (4)

Les données sont présentées en (i) moyenne (Déviation Standard) (m (DS)) ou (ii) pourcentage (nombre) (% (n))

IV. DISCUSSION

Notre étude présente une méthodologie robuste mais également originale. Il s'agit effectivement de la première étude prospective randomisée évaluant l'influence d'un passage d'une tension basse en oxygène (de J0 à J2/3) vers une tension atmosphérique d'O_2 (20% de J2/3 à J5/6) pendant la culture *in vitro* sur le développement embryonnaire humain. En effet, malgré de nombreux essais contrôlés randomisés ayant évalué l'impact de la tension réduite en oxygène, aucun n'a étudié un passage de 5 à 20% d'O_2 en cours de culture (*Tableau 7*). La majorité des études ont comparé des cultures exclusivement à 5 ou 20% d'O_2 (Dumoulin et *al.*, 1999; Guo et *al.*, 2014; Kasterstein et *al.*, 2013; Kovacic et *al.*, 2010; Santos et *al.*, 2013; Waldenström et *al.*, 2009), et certaines ont étudié le passage de 20 à 5% d'O_2 avant la compaction des embryons (à J2 ou J3) (Ciray et *al.*, 2009; Kea et *al.*, 2007; Peng et *al.*, 2015). Ainsi, le passage de 5 à 20% n'a jusque-là été étudié que chez la souris par Wale et Gardner (Wale and Gardner, 2010).

De plus, notre étude présente plusieurs avantages par rapport aux données disponibles dans la littérature à ce sujet, à savoir : (i) un effectif important, (ii) une population homogène (les différences démographiques et cliniques retrouvées étant considérées comme sans impact sur les paramètres analysés) et (iii) une population de bon pronostic concernant l'analyse des CP. Pour ce dernier point, les CP ont en effet été indiquées d'emblée pour la présence de nombreux embryons de bonne qualité aux stades précoces du développement, et non uniquement sur une mise en culture étendue sur la seule présence d'embryons surnuméraires indépendamment de leur qualité morphologique (comme cela a été fait dans plusieurs essais (Dumoulin et *al.*, 1999; Guo et *al.*, 2014; Kasterstein et *al.*, 2013)). Un dernier point d'importance nous permettant de fiabiliser nos conclusions concerne les conditions de culture embryonnaire, identiques pour chacun des groupes dans notre travail en dehors de la tension en oxygène, faisant de ce paramètre la seule variable d'étude. Par contre, une partie des données de la littérature sur ce sujet soit (i) font état d'utilisation d'incubateurs de différents types selon que la culture embryonnaire était effectuée à 20% (incubateurs standards de grand volume) ou 5% d'O_2 (incubateurs à chambre d'incubation de volume réduit, permettant une culture individuelle des embryons d'une même patiente), soit (ii) ne précisent pas ce point, biaisant leurs conclusions. Ainsi, les embryons cultivés à 20% d'O_2 dans ces études provenaient ou pourraient provenir de plusieurs patientes et regroupées dans la même enceinte, augmentant le risque de stress par ouverture multiple de porte, et donc de défauts de développement (Fujiwara et *al.*, 2007; Sermondade et *al.*, 2017). Ce dernier point représente ainsi un facteur confondant majeur, potentiel ou avéré, aux résultats de ces études (*Tableau 7*). Pour notre part, nous avons utilisé les deux mêmes types d'incubateurs à chambres individuelles pour étudier l'impact de la tension en O_2 lors de toutes les cultures embryonnaires incluses dans notre travail, ce qui renforce la qualité méthodologique de notre étude.

Contrairement aux résultats d'études précédentes, aucune différence significative n'a été obtenue dans notre étude concernant la fécondation (Peng et *al.*, 2015) et la qualité embryonnaire à J2 et J3 (Guo et *al.*, 2014; Kasterstein et *al.*, 2013; Kovacic et *al.*, 2010; Santos et *al.*, 2013). Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment publiés par Dumoulin et *al.* en 1999. Cependant, seul le taux de clivage précoce observé à la 25^{e} heure était significativement amélioré par une tension plus physiologique en oxygène, ce qui n'avait jusqu'ici jamais été mis en évidence. Dans plusieurs études prospectives (Hesters et *al.*, 2008; Lundin et *al.*, 2001; Mizobe et *al.*, 2016; Terriou et *al.*, 2007), le clivage précoce a clairement été désigné comme marqueur de bon pronostic pour les issues biologiques et cliniques des tentatives d'AMP car associé d'une part à une amélioration de la qualité embryonnaire précoce (meilleur taux d'embryon TOP J2, et d'autre part à une augmentation des taux d'implantation et de grossesse évolutive.

Ainsi l'augmentation hautement significative du taux de clivage précoce à H25 telle qu'observée dans notre étude démontre l'intérêt potentiel de la culture embryonnaire en tension réduite en oxygène, ce, même en l'absence de modifications significatives des autres paramètres morphologiques embryonnaires évalués à J2 et/ou J3.

Concernant l'analyse des CP, le taux de blastoformation était comparable entre nos trois groupes. Sur ce dernier paramètre, les données de la littérature sont controversées. En effet, notre étude est la seule avec celles des équipes de Kasterstein et Kea à ne pas avoir trouvé d'amélioration de la blastoformation en condition de culture hypoxique (Kasterstein et *al.* 2013; Kea et *al*. 2007). Cependant, la plupart des études ayant trouvé une différence sur ce paramètre ont étudié les variations d'issues de culture selon la tension en oxygène après CP sur embryons surnuméraires (Dumoulin et *al.*, 1999; Guo et *al.*, 2014). Ce point représente ainsi un biais d'échantillonnage ne permettant pas de discuter les discordances retrouvées entre ces études et la nôtre. Cependant, notre étude montre que la qualité des blastocystes obtenus en condition de tension réduite en oxygène exclusive (groupe B') ou après passage à 20% dès J3 (groupe C), était significativement améliorée lorsque comparée aux blastocystes obtenus en condition exclusivement atmosphérique (groupe A). Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude précédemment publiée (Kovacic et *al*., 2010). Toutefois, aucune différence n'a été observée dans notre travail entre une culture embryonnaire effectuée exclusivement sous tension réduite en oxygène et une culture mixte pour ce paramètre, à savoir sous tension réduite de J0 à J2/3 avec passage sous 20% d'O_2 de J2/3 à J5/6 lors de la CP. Ces résultats originaux sont en faveur d'un potentiel impact négatif du stress oxydatif ciblé uniquement sur le développement embryonnaire précoce chez l'Homme. Cette hypothèse est d'ailleurs vérifiée « en miroir » par certains travaux précédemment publiés qui montrent que débuter à J0 la culture embryonnaire sous tension atmosphérique ne permettait pas d'en corriger les potentiels effets négatifs sur le développement embryonnaire par un passage plus tardif sous 5% d'O_2 à J2 (Peng et *al.*, 2015) ou J3 (Ciray et *al.*, 2009). Réunies, ces 2 études et la nôtre apportent des évidences du seul

impact de la tension en oxygène sur les stades précoces du développement embryonnaire humain, avec une irréversibilité de l'impact délétère du stress oxydatif agissant avant la compaction.

Par ailleurs, le fait que la qualité des blastocystes transférés influence les issues cliniques des tentatives est un consensus dans la littérature et plusieurs équipes spécialisées dans l'étude de cette question ont clairement démontré une corrélation entre la bonne qualité des trois paramètres morphologiques évalués des blastocystes (expansion, MCI et trophectoderme) et les taux d'implantation, de grossesse évolutive et de naissance) (Guerif et *al.*, 2010; Van den Abbeel et *al.*, 2013). Plus récemment, le même type de corrélation a été rapporté entre qualité morphologique du blastocyste et taux d'euploïdie (Minasi et *al.*, 2016).

Ainsi, l'augmentation des nombres d'embryons clivés précocement et de blastocystes de TOP qualité en tension réduite en oxygène devrait permettre l'amélioration des issues cliniques des tentatives d'AMP. Cela n'est pas le cas dans notre étude concernant les l'analyse des transferts frais, probablement en raison d'un nombre important de « freeze-all » en cas de CP. Par ailleurs, les embryons choisis pour les transferts frais étaient ceux de qualité optimale et finalement le plus souvent disponibles dans tous les groupes, expliquant pour partie cette absence de différence. Cependant, l'étude des taux cumulés de grossesse, considérant les issues des transferts d'embryons congelés ultérieurs, devrait mathématiquement permettre d'associer les taux de succès en AMP aux cultures embryonnaires effectuées sous tension réduite en oxygène pendant les stades précoces. Ce point reste à démontrer dans notre étude.

L'un des principaux biais de notre étude est l'absence d'observation morphologique en aveugle de l'origine des embryons ainsi que l'absence d'analyse de la morphocinétique embryonnaire par technologie Time-lapse. Cette dernière technique aurait effectivement permis à coup sûr une interprétation à la fois plus précise et moins subjective de la qualité morphologique embryonnaire. Cependant, même si pertinents, ces deux points demandent des moyens humains et matériels indisponibles dans notre laboratoire et dans la plupart des équipes ayant publié sur ce sujet.

En résumé, la tension réduite en oxygène (plus physiologique) semble nécessaire, mais seulement de J0 à J2/3 (avant la compaction embryonnaire). Ces résultats originaux montrent l'incapacité des embryons humains à s'adapter à un environnement sub-optimal lié au stress oxydatif (et peut-être à d'autres facteurs extérieurs perturbateurs) lors du développement précoce. Il semble cependant qu'ils acquièrent une meilleure capacité d'adaptation après l'activation du génome embryonnaire.

Tableau 7 : Récapitulatif des résultats des principaux essais contrôlés randomisés évoqués

Auteurs	Design de l'étude	Type d'incubateur	Effectif	Taux de fécondation	Embryons précoces TOP/bonne qualité	Blastoformation	Blastocystes TOP/bonne qualité	TI	TG	FCS
Dumoulin et *al.* *1999*	**5% *vs.* 20%** Transfert J2/3 CP surnuméraire	Standard : Napco double-chambre 7300 (1 chambre à 5%, 1 chambre à 20%)	1380 cycles FIV/ICSI	NS	NS	**5% > 20%***		NS	NS	
Kea et *al.* *2007*	**5% *vs.* 20% jusqu'à J3** Transfert à J3/J5 **Si CP: passage à 5%**	Identiques à priori mais type non précisé	106 cycles FIV/ICSI/Mixte (1045 ovocytes) (22 CP)	NS	**5% > 20% *** (J3 : MES) [21 *vs.* 17]	NS			NS	
Waldenström et *al.* *2009*	**5% *vs.* 20%,** Transfert J5/6	Standards et identiques pour les 2 groupes (Labrum Klimat)	600 cycles FIV/ICSI (396 CP)	NS		5% > 20% * [48% *vs.* 42%]	NS			NS
Ciray et *al.* *2009*	**5% *vs.* 20-5%** (changement J3) Transfert J5/6 « sibling oocyte model »	Standards et 2 modèles : - ThermoForma, Model 3141; - Forma Scientific (Groupes non précisés)	75 cycles ICSI (2061 ovocytes)	NS	**5% > 20% *** (J3 TOP) [40 *vs.* 33%]	**5% > 20-5% *** [48 *vs.* 42%]	**5% > 20-5% *** (nombre J5 bonne qualité) [16 *vs.* 11%]			
Kovacic et *al.* *2010*	**5% *vs.* 20%** Transfert J3/J5	Standards et identiques pour les 2 groupes (CB 150, Binder)	647 cycles ICSI	NS	**5% > 20% **** (J2) [55% *vs.* 39%]	**5% > 20% *** (taux blastocyste et morula) [59.5% *vs.* 54%]	**5% > 20% **** (nombre J5 TOP) [16% *vs.* 8%]	NS	**5% > 20% *** - cumulés [38 *vs. 28%*] - évolutive : NS	
Kasterstein et *al., 2013*	**5% *vs.* 20%** Transfert J3 CP surnuméraire « sibling oocyte model »	Standards et identiques pour les 2 groupes (NU-4950-E, NuAire)	258 cycles ICSI (3638 MII)	NS	**5% > 20% *** (TOP J3) [1,26 *vs.* 1,01]	NS		**5% > 20% *** [22 *vs.* 10%]	**5% > 20% *** [38 *vs.* 18%]	
Santos et *al.* *2013*	**5% *vs.* 20%** Transfert J3	Standards et identiques pour les 2 groupes (Sanyo MCI 5M)	1125 cycles	NS	**5% > 20% *** (J3 TOP) [32 *vs.* 29%]			NS	NS : clinique, évolutive, cumulés	
Guo et *al.* *2014*	**5% *vs.* 20%** Transfert J3 CP surnuméraire	- 20% : Labotect C200 (standard) - 5% : K-Minc 1000 (individuel)	92 cycles FIV (1254 ovocytes)	NS	**5% > 20% *** (J3 TOP) [72 *vs.* 64%]	**5% > 20% *** [65 *vs.* 53%]	NS	**5% > 20% **** [58 *vs.* 24%]	**5% > 20% *** (clinique par ET) [64 *vs.* 26%]	
Peng et *al.* *2015*	**5% *vs.* 20-5%** (changement J2) ***vs.* 5%**	- 20% : Sanyo (MCO-5AC) (standard) - 5% : K-Minc 1000 (individuel)	3484 cycles FIV/ICSI	**5% > 20% *** **20% > 20-5% *** [80 *vs.* 85 *vs.* 84%]	**20% > 20-5% *** (J3 bonne qualité) [68 *vs.* 67%]			FIV : **5% > 20% *** **20 > 20-5% *** **5 > 20-5% *** [82 *vs.* 79 *vs.* 85%] ICSI : NS	FIV : **5 > 20-5% *** [52 *vs.* 47%] ICSI : NS	NS
Notre étude 2018	**20% *vs.* 5% *vs.* 5-20%** (changement J3) Transfert J2/3/5	Individuels et identiques pour les 2 groupes (K-System, Origio)	691 cycles FIV/ICSI (6304 embryons) 258 CP (2127 blastocystes)	NS	NS	NS	Nombre J5 TOP qualité : **5% > 20% *** **5-20% > 20% *** **5-20% = 5% *** [1,9 *vs.* 2,7 *vs.* 2,6] (pour 20 *vs.* 5 *vs.* 5-20)	NS	NS	NS

*TI : taux d'implantation ; TG : taux de grossesse ; FCS : fausse couche spontanée ; NS : non significatif ; MES : mean embryo score ; * p<0,05 ; ** p<0,0*

V. CONCLUSION

Dans un premier temps, notre étude, d'une méthodologie fiable permettant des conclusions pertinentes, n'a pas montré d'impact du stress oxydatif sur la culture embryonnaire précoce en dehors de l'amélioration de la cinétique de clivage à J1. Cependant, l'augmentation du taux de clivage précoce des ovocytes fécondés a précédemment largement été publiée comme marqueur d'intérêt en AMP.

Dans un deuxième temps, notre étude a montré qu'en cas de CP, la tension réduite en oxygène améliorait significativement le développement embryonnaire en augmentant la qualité morphologique des blastocystes formés. Le lien entre qualité morphologique des blastocystes et l'obtention d'une naissance a, là aussi, largement été démontré.

Enfin, notre étude démontre pour la première fois à notre connaissance que la diminution du stress oxydatif n'était nécessaire qu'aux stades précoces du développement embryonnaire. Ce dernier résultat prouve ainsi la meilleure capacité d'homéostasie des embryons après l'activation génomique.

BIBLIOGRAPHIE

1. *Agarwal, A., Saleh, R.A., and Bedaiwy, M.A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil. Steril. 79, 829–843.*
2. *Al-Gubory, K.H., Fowler, P.A., and Garrel, C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. Int. J. Biochem. Cell Biol. 42, 1634–1650.*
3. *Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Hum. Reprod. 26, 1270–1283.*
4. *Baltz, J.M., Biggers, J.D., and Lechene, C. (1990). Apparent absence of Na+/H+ antiport activity in the two-cell mouse embryo. Dev. Biol. 138, 421–429.*
5. *Barberet, J., Chammas, J., Bruno, C., Valot, E., Vuillemin, C., Jonval, L., Choux, C., Sagot, P., Soudry, A., and Fauque, P. (2018). Randomized controlled trial comparing embryo culture in two incubator systems: G185 K-System versus EmbryoScope. Fertil. Steril. 109, 302–309.e1.*
6. *Biggers, J.D. (1998). Reflections on the culture of the preimplantation embryo. Int. J. Dev. Biol. 42, 879–884.*
7. *Biggers, J.D., and Racowsky, C. (2002). The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM(AA) medium: is a two-step protocol necessary? Reprod. Biomed. Online 5, 133–140.*
8. *Burton, G.J., and Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology 25, 287–299.*
9. *Burton, G.J., Hempstock, J., and Jauniaux, E. (2003). Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. Reprod. Biomed. Online 6, 84–96.*
10. *Chi, H.-J., Koo, J.-J., Choi, S.-Y., Jeong, H.-J., and Roh, S.-I. (2011). Fragmentation of embryos is associated with both necrosis and apoptosis. Fertil. Steril. 96, 187–192.*
11. *Ciray, H.N., Aksoy, T., Yaramanci, K., Karayaka, I., and Bahceci, M. (2009). In vitro culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes. Fertil. Steril. 91, 1459–1461.*
12. *Dailey, T., Dale, B., Cohen, J., and Munné, S. (1996). Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. Am. J. Hum. Genet. 59, 176–184.*
13. *Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 82, 47–95.*
14. *Dumoulin, J.C.M., Meijers, C.J.J., Bras, M., Coonen, E., Geraedts, J.P.M., and Evers, J.L.H. (1999). Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture*. Hum. Reprod. 14, 465–469.*
15. *Fanchin, R., Ayoubi, J.M., Righini, C., Olivennes, F., Schönauer, L.M., and Frydman, R. (2001). Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. Hum. Reprod.*

16, 1115–1119.

16. *Fauque, P., Léandri, R., Merlet, F., Juillard, J.-C., Epelboin, S., Guibert, J., Jouannet, P., and Patrat, C. (2007). Pregnancy outcome and live birth after IVF and ICSI according to embryo quality. J. Assist. Reprod. Genet. 24, 159–165.*
17. *Fragouli, E., and Wells, D. (2011). Aneuploidy in the human blastocyst. Cytogenet. Genome Res. 133, 149–159.*
18. *Fujimoto, V.Y., Browne, R.W., Bloom, M.S., Sakkas, D., and Alikani, M. (2011). Pathogenesis, developmental consequences, and clinical correlations of human embryo fragmentation. Fertil. Steril. 95, 1197–1204.*
19. *Fujiwara, M., Takahashi, K., Izuno, M., Duan, Y.R., Kazono, M., Kimura, F., and Noda, Y. (2007). Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after in-vitro fertilization: comparison of top-load mini incubator and conventional front-load incubator. J. Assist. Reprod. Genet. 24, 5–9.*
20. *Gardner, D.K., and Lane, M. (1997). Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? Hum. Reprod. Update 3, 367–382.*
21. *Gardner, D.K., and Leese, H.J. (1990). Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. J. Reprod. Fertil. 88, 361–368.*
22. *Gardner, D.K., and Schoolcraft, W.B. (1999). Culture and transfer of human blastocysts. Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 11, 307–311.*
23. *Gardner, D.K., Lane, M., Calderon, I., and Leeton, J. (1996). Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. Fertil. Steril. 65, 349–353.*
24. *Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., Wagley, L., Schlenker, T., Stevens, J., and Hesla, J. (1998a). A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. Hum. Reprod. 13, 3434–3440.*
25. *Gardner, D.K., Vella, P., Lane, M., Wagley, L., Schlenker, T., and Schoolcraft, W.B. (1998b). Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. Fertil. Steril. 69, 84–88.*
26. *Gardner, D.K., Lane, M., Stevens, J., and Schoolcraft, W.B. (2001). Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. Fertil. Steril. 76, 1175–1180.*
27. *Giorgetti, C., Terriou, P., Auquier, P., Hans, E., Spach, J.L., Salzmann, J., and Roulier, R. (1995). Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. Hum. Reprod. 10, 2427–2431.*
28. *Glujovsky, D., and Farquhar, C. (2016). Cleavage-stage or blastocyst transfer: what are the benefits and harms? Fertil. Steril. 106, 244–250.*
29. *Goto, Y., Noda, Y., Mori, T., and Nakano, M. (1993). Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. Free Radic. Biol. Med. 15, 69–75.*
30. *Gott, A.L., Hardy, K., Winston, R.M., and Leese, H.J. (1990). Non-invasive measurement*

of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. Hum. Reprod. 5, 104–108.

31. *Guerif, F., Lemseffer, M., Blanchard, M., and Royere, D. (2009). Top quality embryos at day 2: a prerequisite for single blastocyst transfer? An observational cohort study in women under 36. J. Assist. Reprod. Genet. 26, 443–449.*
32. *Guerif, F., Lemseffer, M., Leger, J., Bidault, R., Cadoret, V., Chavez, C., Gasnier, O., Saussereau, M.H., and Royere, D. (2010). Does early morphology provide additional selection power to blastocyst selection for transfer? Reprod. Biomed. Online 21, 510–519.*
33. *Guerif, F., Frapsauce, C., Chavez, C., Cadoret, V., and Royere, D. (2011). Treating women under 36 years old without top-quality embryos on day 2: a prospective study comparing double embryo transfer with single blastocyst transfer. Hum. Reprod. 26, 775–781.*
34. *Guérin, P., El Mouatassim, S., and Ménézo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum. Reprod. Update 7, 175–189.*
35. *Guo, N., Li, Y., Ai, J., Gu, L., Chen, W., and Liu, Q. (2014). Two different concentrations of oxygen for culturing precompaction stage embryos on human embryo development competence: a prospective randomized sibling-oocyte study. Int J Clin Exp Pathol 7, 6191–6198.*
36. *Hammer, M.-A., and Baltz, J.M. (2003). Beta-alanine but not taurine can function as an organic osmolyte in preimplantation mouse embryos cultured from fertilized eggs. Mol. Reprod. Dev. 66, 153–161.*
37. *Hardarson, T., Landuyt, L.V., and Jones, G. (2012). The blastocyst. Hum. Reprod. des230.*
38. *Hardy, K. (1999). Apoptosis in the human embryo. Rev. Reprod. 4, 125–134.*
39. *Hardy, K., Hooper, M.A., Handyside, A.H., Rutherford, A.J., Winston, R.M., and Leese, H.J. (1989). Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. Hum. Reprod. 4, 188–191.*
40. *Herbemont, C., Sarandi, S., Boujenah, J., Cedrin-Durnerin, I., Sermondade, N., Vivot, A., Poncelet, C., Grynberg, M., and Sifer, C. (2017). Should we consider day-2 and day-3 embryo morphology before day-5 transfer when blastocysts reach a similar good quality? Reprod. Biomed. Online 35, 521–528.*
41. *Hesters, L., Prisant, N., Fanchin, R., Méndez Lozano, D.H., Feyereisen, E., Frydman, R., Tachdjian, G., and Frydman, N. (2008). Impact of early cleaved zygote morphology on embryo development and in vitro fertilization-embryo transfer outcome: a prospective study. Fertil. Steril. 89, 1677–1684.*
42. *Higdon, H.L., Blackhurst, D.W., and Boone, W.R. (2008). Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory. Fertil. Steril. 89, 703–710.*
43. *Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA) (2013). Fertility trends en 2013.*

44. *Jones, C.A., Kolomietz, E., Maire, G., Vlasschaert, M., Joseph-George, A.M., Myles-Reid, D., Chong, K., Chitayat, D., and Arthur, R. (2014). PGD for a carrier of an intrachromosomal insertion using aCGH. Syst Biol Reprod Med 60, 377–382.*
45. *Jones, G.M., Trounson, A.O., Gardner, D.K., Kausche, A., Lolatgis, N., and Wood, C. (1998). Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. Hum. Reprod. 13, 169–177.*
46. *Kasterstein, E., Strassburger, D., Komarovsky, D., Bern, O., Komsky, A., Raziel, A., Friedler, S., and Ron-El, R. (2013). The effect of two distinct levels of oxygen concentration on embryo development in a sibling oocyte study. J. Assist. Reprod. Genet. 30, 1073–1079.*
47. *Katz-Jaffe, M.G., Trounson, A.O., and Cram, D.S. (2004). Mitotic errors in chromosome 21 of human preimplantation embryos are associated with non-viability. Mol. Hum. Reprod. 10, 143–147.*
48. *Katz-Jaffe, M.G., Schoolcraft, W.B., and Gardner, D.K. (2006). Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos. Fertil. Steril. 86, 678–685.*
49. *Kea, B., Gebhardt, J., Watt, J., Westphal, L.M., Lathi, R.B., Milki, A.A., and Behr, B. (2007). Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of in vitro fertilization. Fertil. Steril. 87, 213–216.*
50. *Kovacic, B., and Vlaisavljević, V. (2008). Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. Reprod. Biomed. Online 17, 229–236.*
51. *Kovacic, B., Sajko, M.C., and Vlaisavljević, V. (2010). A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil. Steril. 94, 511–519.*
52. *Krisher, R.L., Schoolcraft, W.B., and Katz-Jaffe, M.G. (2015). Omics as a window to view embryo viability. Fertil. Steril. 103, 333–341.*
53. *Lane, M., and Gardner, D.K. (1998). Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. Hum. Reprod. 13, 991–997.*
54. *Lane, M., and Gardner, D.K. (2001). Blastomere Homeostasis. In ART and the Human Blastocyst, (Springer, New York, NY), pp. 69–90.*
55. *Lane, M., and Gardner, D.K. (2005). Mitochondrial malate-aspartate shuttle regulates mouse embryo nutrient consumption. J. Biol. Chem. 280, 18361–18367.*
56. *Lane, M., and Gardner, D.K. (2007). Embryo culture medium: which is the best? Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 21, 83–100.*
57. *Langley, M.T., Marek, D.M., Gardner, D.K., Doody, K.M., and Doody, K.J. (2001). Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments. Hum. Reprod. 16, 902–908.*
58. *Laverge, H., De Sutter, P., Verschraegen-Spae, M.R., De Paepe, A., and Dhont, M.*

(1997). Triple colour fluorescent in-situ hybridization for chromosomes X,Y and 1 on spare human embryos. Hum. Reprod. 12, 809–814.

59. *Lawitts, J.A., and Biggers, J.D. (1991a). Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. J. Reprod. Fertil. 91, 543–556.*
60. *Lawitts, J.A., and Biggers, J.D. (1991b). Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryo culture medium. Biol. Reprod. 45, 245–251.*
61. *Lee, Y.S.L., Thouas, G.A., and Gardner, D.K. (2015). Developmental kinetics of cleavage stage mouse embryos are related to their subsequent carbohydrate and amino acid utilization at the blastocyst stage. Hum. Reprod. 30, 543–552.*
62. *Lopes, A.S., Madsen, S.E., Ramsing, N.B., Løvendahl, P., Greve, T., and Callesen, H. (2007). Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. Hum. Reprod. 22, 558–566.*
63. *Lundin, K., Bergh, C., and Hardarson, T. (2001). Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. Hum. Reprod. 16, 2652–2657.*
64. *Macklon, N.S., Pieters, M.H.E.C., Hassan, M.A., Jeucken, P.H.M., Eijkemans, M.J.C., and Fauser, B.C.J.M. (2002). A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in-vitro human blastocyst development. Hum. Reprod. 17, 2700–2705.*
65. *Magli, M.C., Gianaroli, L., and Ferraretti, A.P. (2001). Chromosomal abnormalities in embryos. Mol. Cell. Endocrinol. 183 Suppl 1, S29-34.*
66. *Magli, M.C., Jones, G.M., Lundin, K., and van den Abbeel, E. (2012). Atlas of human embryology: from oocytes to preimplantation embryos. Preface. Hum. Reprod. 27 Suppl 1, i1.*
67. *Márquez, C., Sandalinas, M., Bahçe, M., Alikani, M., and Munné, S. (2000). Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. Reprod. Biomed. Online 1, 17–26.*
68. *Mastenbroek, S., Twisk, M., van Echten-Arends, J., Sikkema-Raddatz, B., Korevaar, J.C., Verhoeve, H.R., Vogel, N.E.A., Arts, E.G.J.M., de Vries, J.W.A., Bossuyt, P.M., et al. (2007). In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. N. Engl. J. Med. 357, 9–17.*
69. *Mastroianni, L., and Jones, R. (1965). OXYGEN TENSION WITHIN THE RABBIT FALLOPIAN TUBE. J. Reprod. Fertil. 9, 99–102.*
70. *Minasi, M.G., Colasante, A., Riccio, T., Ruberti, A., Casciani, V., Scarselli, F., Spinella, F., Fiorentino, F., Varricchio, M.T., and Greco, E. (2016). Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study. Hum. Reprod. 31, 2245–2254.*
71. *Mizobe, Y., Oya, N., Iwakiri, R., Yoshida, N., Sato, Y., Miyoshi, K., Tokunaga, M., and Ezono, Y. (2016). Effects of early cleavage patterns of human embryos on subsequent in vitro development and implantation. Fertil. Steril. 106, 348–353.e2.*
72. *Nagy, Z.P., Dozortsev, D., Diamond, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Abdelmassih, R., and*

Greco, E. (2003). Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. Fertil. Steril. 80, 67–74.

73. *Nasr-Esfahani, M.H., Aitken, J.R., and Johnson, M.H. (1990). Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. Development 109, 501–507.*
74. *Neuber, E., Rinaudo, P., Trimarchi, J.R., and Sakkas, D. (2003). Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. Hum. Reprod. 18, 1307–1312.*
75. *Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., and Van Steirteghem, A.C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 340, 17–18.*
76. *Papale, L., Fiorentino, A., Montag, M., and Tomasi, G. (2012). The zygote. Hum. Reprod. 27 Suppl 1, i22-49.*
77. *Papanikolaou, E.G., D'haeseleer, E., Verheyen, G., Van de Velde, H., Camus, M., Van Steirteghem, A., Devroey, P., and Tournaye, H. (2005). Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study. Hum. Reprod. 20, 3198–3203.*
78. *Papanikolaou, E.G., Camus, M., Kolibianakis, E.M., Van Landuyt, L., Van Steirteghem, A., and Devroey, P. (2006). In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. N. Engl. J. Med. 354, 1139–1146.*
79. *Papanikolaou, E.G., Kolibianakis, E.M., Tournaye, H., Venetis, C.A., Fatemi, H., Tarlatzis, B., and Devroey, P. (2008). Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. Hum. Reprod. 23, 91–99.*
80. *Payne, D., Flaherty, S.P., Barry, M.F., and Matthews, C.D. (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. Hum. Reprod. 12, 532–541.*
81. *Peng, Z.-F., Shi, S.-L., Jin, H.-X., Yao, G.-D., Wang, E.-Y., Yang, H.-Y., Song, W.-Y., and Sun, Y.-P. (2015). Impact of oxygen concentrations on fertilization, cleavage, implantation, and pregnancy rates of in vitro generated human embryos. Int J Clin Exp Med 8, 6179–6185.*
82. *Phillips, K.P., and Baltz, J.M. (1999). Intracellular pH regulation by HCO3-/Cl- exchange is activated during early mouse zygote development. Dev. Biol. 208, 392–405.*
83. *Prados, F.J., Debrock, S., Lemmen, J.G., and Agerholm, I. (2012). The cleavage stage embryo. Hum. Reprod. 27 Suppl 1, i50-71.*
84. *Pribenszky, C., Nilselid, A.-M., and Montag, M. (2017). Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. Reprod. Biomed. Online 35, 511–520.*
85. *Quinn, P., Stone, B.A., and Marrs, R.P. (1990). Suboptimal laboratory conditions can affect pregnancy outcome after embryo transfer on day 1 or 2 after insemination in vitro.*

Fertil. Steril. 53, 168–170.

86. *Racowsky, C., Jackson, K.V., Cekleniak, N.A., Fox, J.H., Hornstein, M.D., and Ginsburg, E.S. (2000). The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. Fertil. Steril. 73, 558–564.*
87. *Sallem, A., Santulli, P., Barraud-Lange, V., Le Foll, N., Ferreux, L., Maignien, C., Bourdon, M., Chapron, C., de Ziegler, D., Wolf, J.-P., et al. (2017). Extended culture of poor-quality supernumerary embryos improves ART outcomes. J. Assist. Reprod. Genet.*
88. *Santos, M.J. de los, Gámiz, P., Albert, C., Galán, A., Viloria, T., Pérez, S., Romero, J.L., and Remohí, J. (2013). Reduced oxygen tension improves embryo quality but not clinical pregnancy rates: a randomized clinical study into ovum donation cycles. Fertility and Sterility 100, 402–407.*
89. *Schoolcraft, W.B., Fragouli, E., Stevens, J., Munne, S., Katz-Jaffe, M.G., and Wells, D. (2010). Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. Fertil. Steril. 94, 1700–1706.*
90. *Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., and Miller, B. (2000). The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. Hum. Reprod. 15, 2394–2403.*
91. *Scott, L., Berntsen, J., Davies, D., Gundersen, J., Hill, J., and Ramsing, N. (2008). Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Human oocyte respiration-rate measurement--potential to improve oocyte and embryo selection? Reprod. Biomed. Online 17, 461–469.*
92. *Sermondade, N., Herbemont, C., Boujenah, J., Sonigo, C., Cedrin-Durnerin, I., Grynberg, M., and Sifer, C. (2017). Culturing human embryos in benchtop/topload incubators improves clinical outcomes compared with large-box conventional incubation systems. (Eshre 2017).*
93. *Shoukir, Y., Chardonnens, D., Campana, A., Bischof, P., and Sakkas, D. (1998). The rate of development and time of transfer play different roles in influencing the viability of human blastocysts. Hum. Reprod. 13, 676–681.*
94. *Staessen, C., Platteau, P., Van Assche, E., Michiels, A., Tournaye, H., Camus, M., Devroey, P., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. (2004). Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. Hum. Reprod. 19, 2849–2858.*
95. *Steeves, C.L., and Baltz, J.M. (2005). Regulation of intracellular glycine as an organic osmolyte in early preimplantation mouse embryos. J. Cell. Physiol. 204, 273–279.*
96. *Swain, J.E., Carrell, D., Cobo, A., Meseguer, M., Rubio, C., and Smith, G.D. (2016). Optimizing the culture environment and embryo manipulation to help maintain embryo developmental potential. Fertil. Steril. 105, 571–587.*
97. *Terriou, P., Giorgetti, C., Hans, E., Salzmann, J., Charles, O., Cignetti, L., Avon, C., and Roulier, R. (2007). Relationship between even early cleavage and day 2 embryo score*

and assessment of their predictive value for pregnancy. Reprod. Biomed. Online 14, 294–299.

98. *Thomas, M.R., Sparks, A.E., Ryan, G.L., and Van Voorhis, B.J. (2010). Clinical predictors of human blastocyst formation and pregnancy after extended embryo culture and transfer. Fertil. Steril. 94, 543–548.*
99. *Van Blerkom, J., Davis, P., and Alexander, S. (2001). A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos. Hum. Reprod. 16, 719–729.*
100. *Van den Abbeel, E., Balaban, B., Ziebe, S., Lundin, K., Cuesta, M.J.G., Klein, B.M., Helmgaard, L., and Arce, J.-C. (2013). Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer. Reprod. Biomed. Online 27, 353–361.*
101. *Waldenström, U., Engström, A.-B., Hellberg, D., and Nilsson, S. (2009). Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. Fertil. Steril. 91, 2461–2465.*
102. *Wale, P.L., and Gardner, D.K. (2010). Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients. Reprod. Biomed. Online 21, 402–410.*
103. *Wale, P.L., and Gardner, D.K. (2016). The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. Hum. Reprod. Update 22, 2–22.*
104. *Werner, M.D., Hong, K.H., Franasiak, J.M., Forman, E.J., Reda, C.V., Molinaro, T.A., Upham, K.M., and Scott, R.T. (2016). Sequential versus Monophasic Media Impact Trial (SuMMIT): a paired randomized controlled trial comparing a sequential media system to a monophasic medium. Fertil. Steril. 105, 1215–1221.*
105. *Wharf, E., Dimitrakopoulos, A., Khalaf, Y., and Pickering, S. (2004). Early embryo development is an indicator of implantation potential. Reprod. Biomed. Online 8, 212–218.*
106. *Zech, N.H., Lejeune, B., Puissant, F., Vanderzwalmen, S., Zech, H., and Vanderzwalmen, P. (2007). Prospective evaluation of the optimal time for selecting a single embryo for transfer: day 3 versus day 5. Fertil. Steril. 88, 244–246.*
107. *Ziebe, S., Petersen, K., Lindenberg, S., Andersen, A.G., Gabrielsen, A., and Andersen, A.N. (1997). Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. Hum. Reprod. 12, 1545–1549.*

Etude prospective randomisée évaluant l'influence de la tension en oxygène sur le développement embryonnaire humain

Contexte : Aucune recommandation n'existe à ce jour sur la teneur en oxygène dans l'air pendant la culture embryonnaire, et, selon la littérature, une tension basse (5%) semble améliorer la qualité morphologique et la capacité de développement *in vitro* des embryons humains, en réduisant le stress oxydatif.

Objectif : l'objectif de cette étude est de confirmer cette hypothèse, tout en précisant quel stade du développement embryonnaire est impacté.

Matériel & Méthodes : pour cela, notre étude prospective randomisée a comparé 3 conditions de culture embryonnaire lors de tentatives de FIV/ICSI : (i) 20% d'O_2 ; (ii) 5% ; et (iii) 5% jusqu'à J3 puis passage à 20%. Les cycles inclus répondaient aux critères d'inclusion suivants : (i) tentative d'AMP intraconjugale, (ii) âge de la femme < 40 ans, (iii) ≥ 8 ovocytes recueillis à la ponction.

Résultats : la comparaison entre les groupes à 20% (n=241 tentatives) *vs.* 5% (n=450) d'O_2 n'a pas montré d'amélioration de la qualité embryonnaire précoce, mais l'augmentation du clivage précoce en tension réduite en O_2. Par ailleurs, la comparaison entre les 3 groupes a mis en évidence une différence de qualité des blastocystes à J5+6 en défaveur du groupe à 20% (n=83) *vs.* 5% (n= 88) et *vs.* 5-20% (n=87) : [Nombre de blastocystes TOP J5+6 : 2,1% *vs.* 3,0% et *vs.* 3,0% respectivement, p<0,05], sans différence entre le groupe exclusivement à 5% et celui passé à 20% pour la culture prolongée. Les taux de blastoformation étaient identiques.

Conclusion : ces résultats montrent la nécessité de la diminution du stress oxydatif seulement aux stades précoces du développement embryonnaire.

Mots clés : culture embryonnaire, tension en oxygène, qualité embryonnaire, culture prolongée

Université Paris Descartes

Faculté de Médecine Paris Descartes

15, rue de l'Ecole de Médecine

75270 Paris cedex 06