



HAL
open science

Validation d'un plan de suivi métrologique du pH en culture embryonnaire

Quentin Renault

► **To cite this version:**

Quentin Renault. Validation d'un plan de suivi métrologique du pH en culture embryonnaire. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03352300

HAL Id: dumas-03352300

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03352300>

Submitted on 23 Sep 2021

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

Année : 2021

Validation d'un plan de suivi métrologique du pH en culture embryonnaire

MÉMOIRE

DU DIPLOME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

TENANT LIEU DE

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Par M. Quentin RENAUT

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE GRENOBLE

Le 03/09/2021

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Présidente du jury :

Mme le Professeur Sylviane HENNEBICQ

Membres :

Mme le Professeur Pascale HOFFMANN

M. le Professeur Patrice FAURE

M. le Docteur Julien BESSONNAT (directeur de thèse)

L'UFR de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Doyen de la Faculté : Pr. Patrice MORAND

Année 2020-2021

ENSEIGNANTS DE L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENUM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
PU-PH	APTEL Florent	Ophtalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	BAILLET Athan	Rhumatologie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
MCF Ass.MG	BENDAMENE Farouk	Médecine Générale
PU-PH	BENHAMOU Pierre-Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
PU-PH	BLAISE Sophie	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire
PR Ass. Méd.	BOILLOT Bernard	
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Nutrition
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PR Ass.MG	BOUCHAUD Jacques	Médecine Générale
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
MCU-PH	BOUSSAT Bastien	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	BOUZAT Pierre	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
PU-PH émérite	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
PU-PH émérite	BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique-médecine de la douleur ; Addictologie
PU-PH émérite	CAHN Jean-Yves	Hématologie
PU-PH émérite	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PR Ass.MG	CARRILLO Yannick	Médecine Générale
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie
MCF Ass.MG	CHAMBOREDON Benoît	Médecine Générale
PU-PH	CHARLES Julie	Dermato-vénérologie
MCF Ass.MG	CHAUVET Marion	Médecine Générale
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophtalmologie
PU-PH	CHIRICA Mircea	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	CLAVARINO Giovanna	Immunologie
PU-PH	COHEN Olivier	Histologie, embryologie et cytogénétique
PU-PH	COURVOISIER Aurélien	Chirurgie infantile
PU-PH	COUTTON Charles	Génétique
PU-PH	COUTURIER Pascal	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PU-PH	DEBATY Guillaume	Médecine d'Urgence
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PR Ass. Méd.	DEFAYE Pascal	Cardiologie
PU-PH	DEGANO Bruno	Pneumologie ; addictologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PU-PH émérite	DEMONGEOT Jacques	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
PU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies infectieuses ; Maladies tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie viscérale et digestive
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaétan	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	GIOT Jean-Philippe	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; Brûlologie
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH émérite	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
MCU-PH	GUZUN Rita	Nutrition
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH émérite	HALIMI Serge	Nutrition
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
PU-PH émérite	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale

CORPS	NOM-PRENUM	Discipline universitaire
PU-PH émérite	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
MCU-PH	KASTLER Adrien	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	KRAÏNIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	LABLANCHE Sandrine	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie – virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	LANTUEJOL Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
PR Ass. Méd.	LARAMAS Mathieu	Cancérologie ; radiothérapie
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU - PH	LE GUELLEC LE PISSART Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
MCF Ass.MG	LEDOUX Jean-Nicolas	Médecine Générale
PU-PH émérite	LETOUBLON Christian	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
PU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
MCU-PH	LUPO Julien	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	MAIGNAN Maxime	Médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Bactériologie – virologie ; Hygiène hospitalière
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie ; Transfusion
PR Ass. Méd.	MATHIEU Nicolas	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
MCU-PH	MC LEER Anne	Histologie, embryologie et cytogénétique
MCU-PH	MONDET Julie	Histologie, embryologie et cytogénétique
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie ; addictologie
MCU-PH	MORTAMET Guillaume	Pédiatrie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie ; radiothérapie
PU-PH émérite	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
MCF Ass.MG	ODDOU Christel	Médecine Générale
PR Ass. Méd.	ORMEZANO Olivier	Cardiologie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PAILHE Régis	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PR Ass.MG	PAUMIER-DESBRIERES Françoise	Médecine Générale
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	PERNOD Gilles	Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie ; Addictologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POIGNARD Pascal	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes ; Addictologie
PU-PH	RAMBEAUD Jean-Jacques	Urologie
PU-PH	RAY Pierre	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PR Ass. Méd.	RECHE Fabian	Chirurgie viscérale et digestive
MCU-PH	RENDU John	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH émérite	RIALLE Vincent	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	RIETHMULLER Didier	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH émérite	ROMANET Jean Paul	Ophtalmologie
PU-PH	ROSTAING Lionel	Néphrologie
PU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie et biologie moléculaire
PR Ass.MG	ROYER DE VERICOURT Guillaume	Médecine Générale
PU-PH émérite	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL Carole	Médecine intensive-réanimation
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH émérite	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses ; Maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	STURM Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Médecine intensive-réanimation
PU-PH	THEVENON Julien	Génétique
MCU-PH	TOFFART Anne-Claire	Pneumologie ; Addictologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VALMARY-DEGANO Séverine	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	VANZETTO Gérard	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUI Philippe	Néphrologie
PU-PH émérite	ZARSKI Jean-Pierre	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie

PU-PH : Professeur des Universités - Praticiens Hospitaliers
 MCU-PH : Maître de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers
 PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale
 MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale
 PR Ass. Méd. : Professeur des Universités Associé de Médecine
 PR Ass.MG : Professeur des Universités Associé de Médecine Générale
 MCF Ass.MG : Maître de Conférences Associé de Médecine Générale

Table des Matières

Remerciements	9
Table des abréviations.....	12
Introduction.....	13
Partie 1 : Fécondation	15
I) Fécondation in vivo	15
1) Gamétogénèse	15
a) Ovogénèse, folliculogénèse et ovulation	15
b) Spermatogénèse et maturation des spermatozoïdes.....	18
2) Fécondation.....	21
3) Développement embryonnaire préimplantatoire	22
4) Environnement utéro-tubaire	24
a) Généralités	24
b) Le pH.....	28
II) Fécondation in vitro	31
1) Stimulation ovarienne	31
2) Récupération, préparation et rencontre des gamètes	33
a) Récupération des ovocytes	33
b) Préparation des spermatozoïdes	34
c) FIV et devenir des embryons.....	35
Partie 2 : Culture embryonnaire	36
I) Paramètres à maîtriser.....	37
1) Qualité de l'air	37
2) Luminosité.....	38
3) Incubateurs	39
a) Température.....	39
b) Taux d'oxygène	40
c) Osmolarité du milieu, humidité et huile de recouvrement.....	41
4) Composition du milieu de culture	41
a) Les substrats énergétiques.....	41
b) Les acides aminés.....	42
c) Les protéines.....	43
d) Autres composants	43
5) Type de culture	44
6) Manipulations	45

II) Le pH des milieux de culture et ses variables	45
1) Importance du pHe en FIV	46
2) Régulation du pHe en FIV.....	46
3) Dynamique du pHe.....	48
4) Facteurs de variabilité du pHe en FIV	50
Partie 3 : Validation de méthode	52
I) Accréditation en France et métrologie	52
1) Accréditation	52
2) Surveillance métrologique	53
II) Maitrise des risques et métrologie en FIV	55
III) Validation de la mesure du pH des milieux de culture	56
Partie 4 : Article original : Validation d'un plan de suivi métrologique du pH en culture embryonnaire.	58
Résumé.....	58
Abstract	59
Introduction.....	60
Matériels et méthodes	61
I) Présentation du matériel	61
1) Système actuel de suivi du CO ₂ dans les incubateurs du laboratoire d'AMP	61
2) Système de mesure du pH évalué.....	61
II) Validation de méthode pour la mesure du pH.....	61
1) Pré-analytique : tests de stress du pH (transport)	61
2) Tests de performance de la méthode	62
a) La répétabilité.....	62
b) La fidélité intermédiaire.....	62
c) La comparaison de méthode	63
d) La contamination inter-échantillon.....	63
III) Stabilité du pH en FIV	64
1) Equilibration du pH	64
2) Etude de corrélation pH/CO ₂	64
3) Stabilité du pH	64
4) Tests de maintien du pH hors incubateur	65
5) Impact de l'huile de recouvrement sur le pH.....	65
6) Comparaison entre incubateurs.....	65
IV) Tests statistiques.....	66
Résultats.....	67

I) Validation de méthode pour la mesure du pH.....	67
1) Pré-analytique : tests de stress du pH (transport)	67
2) Tests de performance de la méthode	67
a) La répétabilité.....	67
b) La fidélité intermédiaire.....	68
c) La comparaison de méthode	68
d) La contamination inter-échantillon.....	69
II) Stabilité du pH en FIV.....	70
1) Equilibration du pH	70
2) Etude de corrélation pH/CO ₂	71
3) Stabilité du pH.....	71
4) Tests de maintien du pH hors incubateur	72
5) Impact de l'huile de recouvrement sur le pH.....	72
6) Comparaison entre incubateurs.....	73
Discussion.....	74
I) Validation de méthode pour la mesure du pH.....	75
II) Stabilité du pH en FIV.....	76
Conclusion	79
Conclusion	80
Bibliographie	82
Résumé.....	91

Remerciements

Aux membres du jury :

A Mme le **Professeur Sylviane HENNEBICQ**, merci d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Merci pour votre écoute et vos conseils tout au long de mon parcours. Merci également de m'avoir permis de continuer quelques mois de plus au sein du laboratoire.

A Mme le **Professeur Pascale HOFFMANN**, merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Merci également pour votre volonté de nous faire découvrir d'autres aspects de la PMA lors des staffs.

A Monsieur le **Professeur Patrice FAURE**, merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour votre pédagogie durant mon semestre passé en biochimie.

A Monsieur le **Docteur Julien BESSONNAT**, merci de t'être proposé (imposé ?) pour diriger ma thèse. Je tiens à te remercier particulièrement de m'avoir proposé ce sujet très intéressant et très « pratico-pratique ». Merci de m'avoir bien guidé dans ce travail et de ne pas avoir encore fait d'AVC pour mes (trop) nombreuses fautes d'orthographe. Merci pour tout ce que tu m'as appris quand même durant mon internat ainsi que pour ton écoute et ta confiance. Finalement, merci surtout pour ta bonne humeur quotidienne.

A toute l'équipe du centre d'AMP :

Aux biologistes passé et présents : merci à **Thomas** pour toute ta formation durant mon internat, tes conseils et ta rigueur (surtout quand tu portes ta casquette à l'envers), merci également de m'avoir souvent laissé gagner au billard (ah bon ?). Merci à **Charlotte** pour ta formation (qu'en FIV par contre, la spermio je suis vite allé voir ailleurs) et ta bonne humeur malgré la gestion difficile de maintenant 3 petits (respect) ! Merci à **Lucie** de m'avoir tant appris également ainsi que pour tes nombreuses fiches de synthèse, merci pour ton calme permanent et des nombreuses pauses café à toute heure, je te souhaite le meilleur pour la suite même si elle n'est plus médicale !

Aux co-internes : merci à **Aurélien²** pour tous ces très très très nombreux moments de délires sans aucun sens durant l'internat (fais leeeeeee). Merci de me reprendre régulièrement sur le Français et de me bien faire savoir que je n'en serai jamais prix Nobel. Continue de bien gérer les spermoc dans le service, je compte sur toi. Je vous souhaite, à Steph et toi, le meilleur pour la suite dans votre immense château, on vous réceptionne à la Guadeloupe quand vous voulez (nous on revient par contre que lorsque vos travaux seront terminés, en 2050 par là).

Aux techniciens : à **Maëva, Ono, Mylène, Emilie², Lynda, Pierre, JB et Franck** merci à tous pour vos temps d'explication technique durant mon internat même si l'activité ne le permettait des fois pas. Je vous souhaite le meilleur dans le nouveau labo et quand même quelques pauses café avec les bonnes rillettes de Maëva !

Aux secrétaires du labo : à **Laurence, Solange et Magalie**, merci pour votre bonne humeur malgré les nombreux moments de pénurie de personnel.

A tous les autres : merci à **Cécile**, à **Marie-Atéa**, aux **gynéco**, aux **sages-femmes** et aux **aides-soignantes** de votre compagnie durant mon internat.

Aux ceux qui m'ont accompagné durant ce cursus médical :

Au #groupe : **Mathieu** merci de toute ta compagnie depuis la P1, des très nombreuses soirées passées beaucoup trop intelligentes, du bon geekage en gueule de bois au lieu de bosser, d'enflammer la piste de dance au ptit bal... bref merci d'être quelqu'un de confiance depuis tout ce temps et d'avoir accepté d'être mon témoin, je te souhaite à **Marie** et toi le meilleur et du bon gros kiff à Annecy (profites en pour apprendre à skier ☺). A **Antoine** (#Bébère), merci également d'être quelqu'un de confiance et de cette complicité qu'on a souvent (à base de 0 de QI), je t'ai montré le chemin qui mène au bodybuilding genitalium à toi de le suivre, merci à **Ines** de continuer à rigoler à mes énormes blagues (sisi), on ira te voir j'espère au Quebec mais on vous attend aussi chez nous ! Enfin, merci à **Clém** (#clemdu38), **Robinou** (t'as pas un balais ?), **Uzan** (« la calotte de tes morts »), **Marouard** (j'ai retrouvé tes lunettes à Budapest) et **Gwen, Malik et Chloé** (à votre tour le bb ☺), **Lucie** (el ch'nord), **Sophie et Jordan** (les professionnels internationaux du molky...), **Sabine et Romain** (bonne suite pleine de montagnes à Annecy !) de vos amitiés depuis l'externat et de tous ces bons moments passés de rigolade.

A la zob team : merci à **Arthurito, VJP et Jus de liane** pour tous ces moments durant l'internat, les très nombreuses soirées qui ne finissent pas toujours bien, les délires, les potins et bien d'autres... J'espère bien sûr que vous viendrez en Guadeloupe (ou à la Réunion Arthur je sais plus ?) bronzer sur la plage et boire du rhum. Arthur je te souhaite de t'enterrer et trouver un bon poste dans ton « pays indépendant » qu'est l'Ardèche (dehors les r...), VJP de faire 4 carrières hospitalo-U, et Julliane de tous nous inviter dans ton château à Dijon bien sûr !

Aux autres que je n'oublie pas : merci à **Florian et Simon** pour toutes ces nombreuses heures passer sur les courts de tennis qui ont fait vraiment du bien (en 5 sets gagnant à 37°C toujours) et on se revoit comme prévu à Roland Garros en tant que joueur. A **Solène**, merci de ta longue amitié depuis l'Isle d'abeau city même si on ne s'est pas beaucoup vu ces derniers temps ; du Canada j'espère bien que tu viendras nous voir (et inversement) ! A **Tim**, merci vraiment au stage de diabéto qui m'a permis de te rencontrer, je t'ai déjà dit ce que je pensais de

toi (#lettredamour si cé nior) quand t'es partit te faire dorer la pilule et on a vraiment hâte de vous rejoindre **Morgane** et toi pour bien d'autres aventures cette fois tropicales.

A ma famille :

A mes parents et mes sœurs : merci à tous les 4 d'être les personnes que vous êtes et d'être toujours là quand il faut... Mille merci aux **Parents** de votre éducation, vos valeurs et votre soutien sans faille et ce, sur tous les plans depuis la première année de médecine. Merci aux 2 sisters de ces fous rires et de cette complicité qu'on a depuis très longtemps, je vous souhaite le meilleur **Marion, Medhi** et bb dans votre nouvelle vie à 3 (peut être bientôt plus ?!) ; **Amélia** je te souhaite de t'épanouir à travailler avec des enfants, ça te va tellement bien (et de trouver un gentil Charles tant qu'à faire... ☺ « ah c'est vrai ce qu'on dit alors »).

Au reste de la famille proche : grosse pensée pour mes **4 grands-parents**, la **team à Basile**, et **tatie et Alain** ; je vous embrasse fort.

A ma belle-famille : merci beaucoup à tous de m'avoir intégré et de m'avoir confié la Miss (même si elle n'est pas facile à gérer tous les jours...☺).

Et pour finir, à la femme de ma vie : **Léa**, juste un immense merci pour la personne que tu es et pour les valeurs que tu incarnes. Merci le destin (et un peu Marie finalement...) de m'avoir fait croiser ton chemin quand j'étais jeune externe, il y a maintenant 8 ans et demi, lors d'une soirée un peu exotique (toujours plus de vinaigre dans les shooter). Depuis, tu ne cesses d'être mon soutien inconditionnel, ma boussole et une équipière à toute épreuve dans la vie. Il y a eu, il y a et il y aura encore de très beaux projets ensemble durant ce cursus de médecine : le mariage, les voyages et maintenant la famille qui s'agrandie... Je vous embrasse très fort tous les deux <3.

Table des abréviations

AMP : Aide Médicale à la Procréation

CCO : Complexe Cumulo-Ovocytaire

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

CSCM-C[®] : Continuous Single Culture Complete[®]

CV : Coefficient de Variation

EMT : Ecart Maximal Toléré

FIV : Fécondation In Vitro

FIVc : FIV conventionnelle

FIV-ICSI : FIV avec Injection Intra-Cytoplasmique de Spermatozoïde

FSH : Follicle-Stimulating Hormone

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone

HCG : Human Chorionic Gonadotropin

HSA : Human Serum Albumin

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

LH : Luteinizing Hormone

pHe : pH externe

pHi : pH interne

PN : Pronucléus

ROS : Reactive Oxygen Species

RP 500 : RapidPoint 500

VOC : Volatile Organic Compound

Introduction

La culture embryonnaire est un des processus critiques de la fécondation in vitro (FIV). En effet, le succès d'une tentative de FIV va dépendre, entre autres, des conditions environnementales auxquelles l'embryon est exposé. Celles-ci doivent se rapprocher le plus possible des conditions retrouvées in vivo, dans le tractus génital féminin, afin d'assurer un développement embryonnaire optimal (*Consensus du Caire 2020*). Cependant, dans un laboratoire d'aide médicale à la procréation (AMP), de nombreux facteurs de stress sont susceptibles d'altérer le développement des embryons, et donc d'impacter négativement le taux de réussite du laboratoire (*Wale and Gardner 2016*). Parmi ceux-ci, le pH des milieux de culture est un paramètre essentiel à maîtriser car capable d'influencer directement le pH intracellulaire, et donc le développement et la survie des embryons (*Lane and Gardner 2000*).

La maîtrise de ce paramètre critique en culture embryonnaire, pour le secteur de la biologie médicale, est encadrée par la norme NF EN ISO 15189 : « le maintien d'un pH approprié du milieu de culture utilisé est essentiel dans un incubateur à CO₂ ». De même, l'arrêté du 30 juin 2017 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation précise que « la composition de l'atmosphère à l'intérieur des incubateurs, par contrôle de la teneur en gaz ou du pH des milieux incubés, est maîtrisée. Une procédure de surveillance du pH et/ou du/des gaz utilisé(s) est mise en place définissant les paramètres de criticité et de surveillance. ». Les fournisseurs des milieux de culture recommandent de maintenir un pH autour de 7.2 - 7.4 (variable selon le milieu), grâce à une atmosphère gazeuse enrichie en CO₂ pendant toute la durée de la culture.

Nous avons souhaité intégrer des mesures du pH de notre milieu de culture à notre stratégie métrologique actuelle, basée sur la mesure de la concentration en CO₂ dans les incubateurs, témoin indirect du pH du milieu. Or, ce dernier est le paramètre critique à maîtriser et il est donc important d'en avoir une mesure directe. Sa mesure à intervalle régulier sera tout à fait complémentaire du suivi du CO₂, dont les outils de mesure permettent plus aisément un suivi en continu (toutes les 15 minutes) par rapport aux mesures du pH.

L'objectif de ce travail est la validation d'un plan de suivi métrologique du pH de notre milieu de culture embryonnaire. Pour répondre à cet objectif, nous avons d'abord cherché à définir les meilleurs délais et conditions de transport possibles du milieu avant la mesure du pH. Puis, nous avons fait une validation de méthode de la mesure du pH par un analyseur à gaz du sang, comprenant notamment une évaluation des critères de performance de la méthode. Cette méthode de mesure du pH validée, nous avons alors pu réaliser une étude de corrélation entre le pH du milieu et le taux de CO₂ présent dans les incubateurs du laboratoire, afin d'intégrer sa mesure au plan de suivi métrologique actuel du CO₂. Enfin, nous avons testé diverses situations au laboratoire pouvant faire varier la valeur de ce pH cible.

Ce travail est décrit dans la partie 4 de ce manuscrit. Les parties 1, 2 et 3 sont des introductions bibliographiques traitant des différentes étapes de la fécondation in vivo et in vitro, de la culture embryonnaire dans un laboratoire d'AMP, de l'accréditation et de la métrologie au cours d'un processus de FIV.

Partie 1 : Fécondation

I) Fécondation in vivo

La fécondation dans l'espèce humaine correspond à l'obtention d'un œuf (appelé zygote) par le biais de la rencontre et de la fusion des deux gamètes matures, mâle et femelle, issus de la gamétogénèse (décrite ci-dessous). La fécondation se déroule dans l'ampoule isthmo-tubaire de la trompe de Fallope.

1) Gamétogénèse

La gamétogénèse est l'ensemble des phénomènes de multiplication, de division et de différenciation des cellules souches germinales (ovogonies et spermatogonies), aboutissant à la production d'un ovocyte et d'un spermatozoïde matures. Ces derniers sont des cellules haploïdes, c'est-à-dire contenant chacun « n » chromosome (un chromosome de chaque paire soit 23 chromosomes), aptes à la fécondation.

a) Ovogénèse, folliculogénèse et ovulation

L'ovogénèse et la folliculogénèse sont des processus discontinus et étroitement liés. Ils débutent pendant la vie intra-utérine, s'interrompent à la fin de la vie fœtale, reprennent à la puberté et se terminent à la ménopause (*Desai et al. 2017*).

A la naissance, les ovaires contiennent des follicules primordiaux. Un follicule primordial est formé d'un ovocyte de premier ordre (ovocytes I) entouré d'une fine couche de cellules folliculaires. Ces ovocytes I sont des cellules immatures et diploïdes, c'est-à-dire contenant « 2n » chromosomes (deux chromosomes de chaque paire soit 46 chromosomes), ayant entamés leur première division méiotique mais bloqués en prophase I.

Le stock de follicules primordiaux est fixé à la naissance à environ un million. Celui-ci diminuera progressivement jusqu'à atteindre environ 400 000 au début de la puberté. L'épuisement de ce stock continue et s'accélère après la puberté pour atteindre une valeur moyenne de 8000 à 45 ans et une valeur nulle à la ménopause.

A partir de la puberté, plusieurs follicules primordiaux vont sortir quotidiennement du pool de réserve et commencer une croissance pour devenir des follicules primaires, secondaires, pré-antraux puis antraux (de taille entre deux et cinq millimètres de diamètre). L'ovocyte, également en croissance à l'intérieur du follicule, va synthétiser des glycoprotéines qui formeront ensuite une coque autour de lui : la zone pellucide.

Cette croissance folliculaire basale est lente, indépendante des gonadotrophines hypophysaires et est contrôlée par différents facteurs de croissance paracrines sécrétés par les cellules folliculaires (KL, LIF, GDF9...).

Certains des facteurs sécrétés, essentiellement par les plus gros follicules (hormone antimüllérienne ou AMH, par exemple), vont également réguler et limiter l'entrée en croissance de nouveaux follicules du pool de réserve.

Au début de chaque cycle féminin (tous les 28 jours en moyenne), les follicules sortis du pool de réserve continuent leur développement jusqu'à l'obtention d'un unique follicule mûr, prêt à ovuler. Ce processus est sous la dépendance des gonadotrophines hypophysaires, la FSH (follicle-stimulating hormone) essentiellement et la LH (luteinizing hormone).

Cette croissance folliculaire dure environ 14 jours, dans l'espèce humaine, et peut se décomposer en trois phases (*figure 1*) :

- **Phase de recrutement :**

Au début de cycle, l'augmentation de la sécrétion antéhypophysaire de FSH va permettre le recrutement et la croissance des follicules exprimant les récepteurs à la FSH (constitution d'une cohorte folliculaire). Les cellules périphériques de la granulosa se développent et sécrètent de plus en plus d'estradiol. Ce recrutement folliculaire est asynchrone car les follicules de la cohorte ont chacun des seuils différents de réponse à la FSH. Les follicules n'exprimant pas ces récepteurs dégénèrent par atresie.

- **Phase de sélection :**

La croissance folliculaire se poursuit tant que le taux de FSH est au-dessus du seuil de développement : cette période définit la fenêtre de FSH. La diminution physiologique de la sécrétion de FSH en milieu de phase folliculaire (rétrocontrôle négatif par l'estradiol sécrété) ferme cette fenêtre et conduit à l'atresie des follicules les moins sensibles.

- **Phase de dominance :**

La diminution du taux de FSH se poursuit et, en fin de phase folliculaire, va permettre au follicule, ayant le seuil de réponse à la FSH le plus bas, de dominer et de finir sa maturation : c'est le follicule pré-ovulatoire (ou follicule mûr ou follicule de de Graaf). Ce follicule dominant va acquérir des récepteurs à la LH et sera donc sensible au pic ovulatoire de LH. Tous les autres follicules en croissance vont dégénérer par atresie dans l'ovaire.

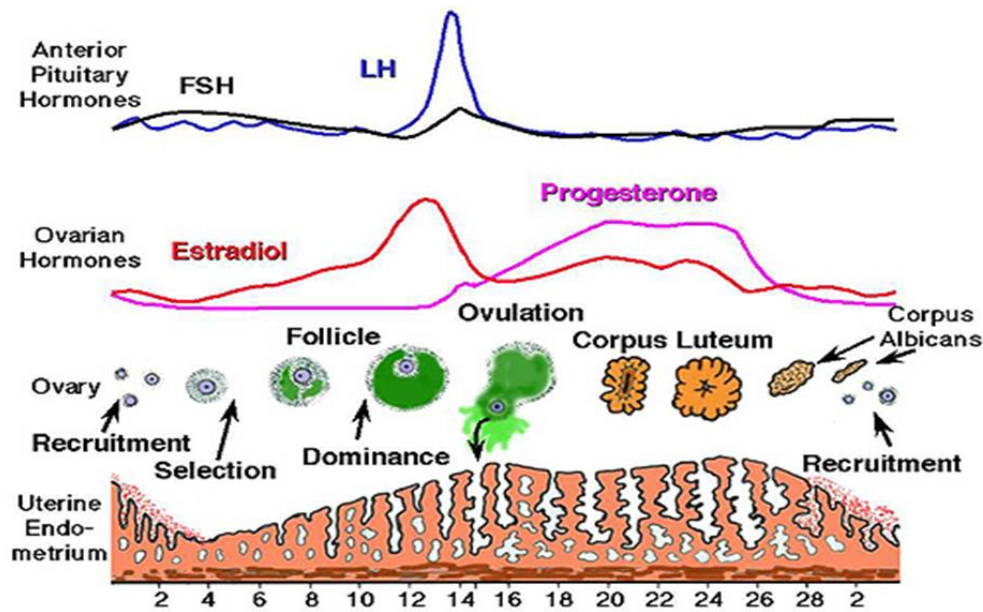


Figure 1 : Contrôle hormonal et dynamique du cycle féminin
 (<http://www.cngof.fr/menu-la-puberte/293-le-fonctionnement-du-cycle>)

Au milieu de cycle (vers le 14^{ème} jour), l'augmentation du taux d'estradiol, au-delà d'un certain seuil, va permettre de lever l'inhibition hypothalamo-hypophysaire et déclencher le pic ovulatoire de LH (rétrocontrôle positif). Environ 36 heures après le pic de LH, le follicule mûr expulse son ovocyte dans la région ampullaire de la trompe et dégénérera ensuite en corps jaune dans l'ovaire (initiant la deuxième partie du cycle ou phase lutéale).

Parallèlement, le pic de LH permet également la fin de maturation de l'ovocyte I. Ce dernier achève sa première division méiotique, expulse son premier GP (globule polaire, possédant la moitié du matériel génétique initial) dans l'espace péri-vitellin (entre la zone pellucide et la membrane ovocytaire) et entame sa deuxième division de méiose (figure 2). Il devient alors un ovocyte de deuxième ordre (ovocyte II), cellule mature haploïde à « n » chromosome à deux chromatides (23 chromosomes).

Après l'ovulation, dans le pavillon de la trompe, l'ovocyte II reste entouré de quelques cellules folliculaires résiduelles qu'il a emporté avec lui (corona radiata et cumulus oophorus), formant le complexe cumulo-ovocytaire (CCO). Il se retrouve dans un état d'instabilité méiotique puisqu'il est bloqué en métaphase II : son fuseau méiotique est en place et les chromosomes sont disposés le long de la plaque équatoriale (figure 2). Cet état cellulaire le rend particulièrement fragile et sensible aux éventuelles variations de son environnement.

A ce stade, l'ovocyte II est apte à être fécondé par un spermatozoïde. En cas de fécondation, celui-ci achèvera sa deuxième division méiotique avec expulsion de son deuxième globule polaire.

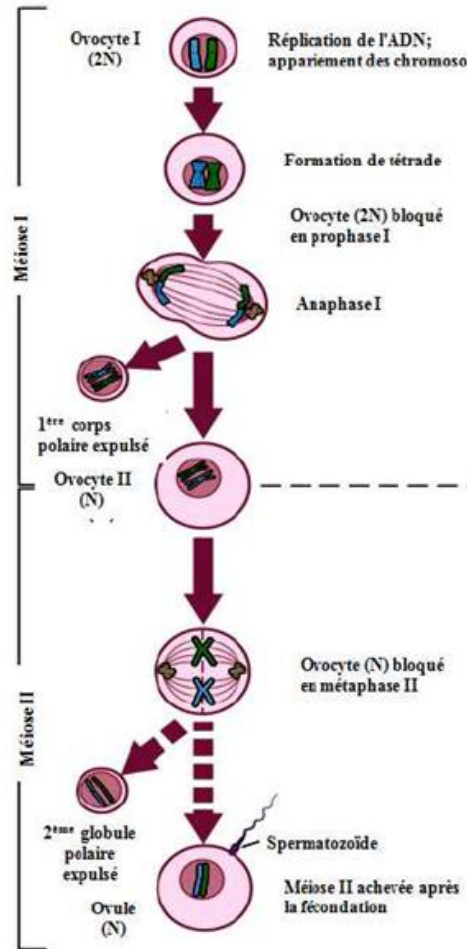


Figure 2 : Méiose I et II au cours de l'ovogénèse (Desai et al. 2017)

b) Spermatogénèse et maturation des spermatozoïdes

La spermatogénèse, contrairement à l'ovogénèse et à la folliculogénèse, est un processus continu de la puberté jusqu'à un âge plus ou moins avancé dans la vie de l'homme. Elle se déroule dans la paroi des tubes séminifères des testicules et un cycle de spermatogénèse dure environ 74 jours. Elle est sous la dépendance de l'axe hypothalamo-hypophysaire et est contrôlée et régulée par les cellules de Sertoli.

Elle se déroule en deux étapes successives (Desai et al. 2017) (figure 3) :

- **La spermatocytogénèse :**

Cette étape débute par la division par mitose des spermatogonies (cellules souches diploïdes à « 2n » chromosome). Certaines de ces spermatogonies vont entrer dans le processus de méiose. La première division méiotique (dite réductionnelle) est caractérisée par la séparation des chromosomes homologues de chaque paire : les spermatogonies se différencient en spermatocytes primaires puis secondaires (cellules haploïdes à « n » chromosome à deux chromatides). La deuxième division méiotique (dite

équationnelle) est caractérisée par la séparation des chromatides sœurs : les spermatocytes secondaires se différencient en spermatides rondes (cellules haploïdes à « n » chromosome à une chromatide).

- **La spermiogénèse :**

C'est une étape post-méiotique qui correspond à la différenciation des spermatides rondes en spermatozoïdes. Ce processus comprend : la formation de l'acrosome (grande vacuole située au sommet de la tête du spermatozoïde, riche en enzymes), la formation du flagelle et la maturation nucléaire.

La libération des spermatozoïdes dans la lumière de l'épithélium séminifère est appelée spermiation et correspond à l'étape finale de la spermatogénèse.

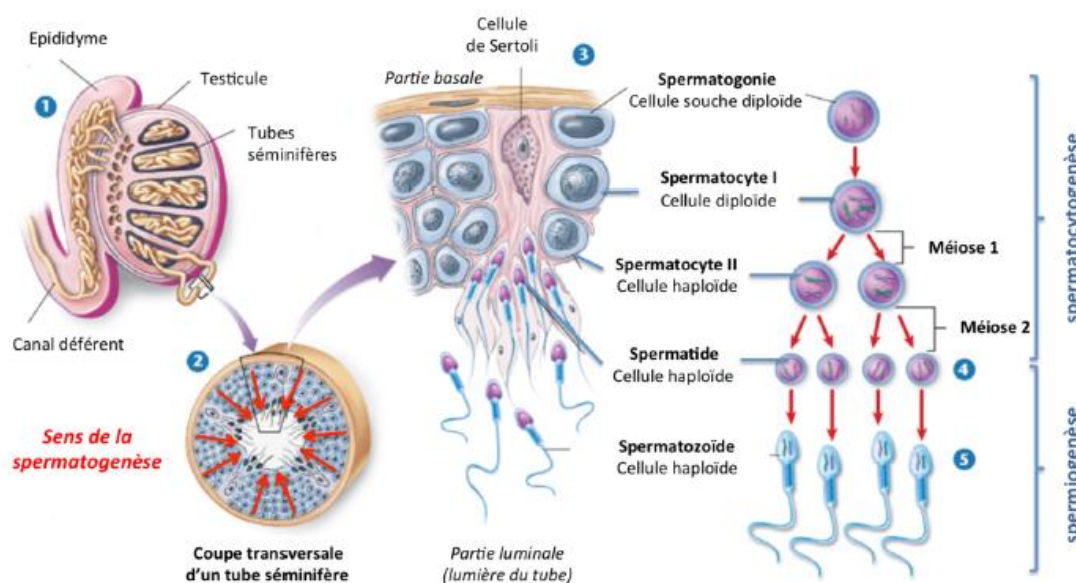


Figure 3 : La spermatogénèse
<http://www.zo.utexas.edu/faculty/sjasper/images/f36.12.jpg>

A la sortie des testicules, les spermatozoïdes, bien qu'ayant leur morphologie finale, sont encore immatures et non féconds (mobilité nulle ou sur place).

La 1^{ère} étape de maturation post-testiculaire des spermatozoïdes se déroule lors de leur passage dans l'épididyme, avec, entre autre, l'acquisition d'une mobilité progressive.

Cette maturation continue et se termine après l'éjaculation, dans les voies génitales féminines où ils subissent de multiples modifications fonctionnelles et structurales : ces phénomènes définissent la capacitation. La capacitation est indispensable pour l'acquisition du pouvoir fécondant final du spermatozoïde.

Schématiquement, la capacitation est permise par :

- **L'élimination de facteurs inhibiteurs :**

Lors du rapport sexuel, après l'éjaculation, les spermatozoïdes, baignant dans le liquide séminal, sont déposés dans le vagin. En période ovulatoire, le pH alcalin (> 7) et les mailles lâches de la glaire cervicale permettent aux spermatozoïdes de survivre et de traverser le col utérin. Lors de leur traversée, ils interagissent avec certaines molécules du mucus cervical (glycosaminoglycanes) qui les débarrasseront de nombreux facteurs décapacitants, contenus dans le plasma séminal ou fixés à leur surface.

- **L'action de facteurs capacitants sécrétés par le tractus féminin (figure 4) :**

Après passage du col utérin, les spermatozoïdes entrent dans un nouvel environnement, en contact étroit avec les sécrétions utérines.

Parmi les molécules présentes dans ce nouvel environnement, indispensables à l'initiation de la capacitation, on peut citer notamment :

- l'albumine : elle est capable de capter le cholestérol de la membrane spermatique, permettant l'augmentation de sa fluidité, la redistribution de ses composants et sa symétrisation.

- les ions bicarbonates (HCO_3^-) et calciques (Ca^{2+}) : leur entrée intracellulaire, via des canaux ioniques membranaires, est permise par l'action préalable de l'albumine sur la membrane spermatique. Elle va entraîner une alcalinisation et une hyperpolarisation intra-spermatiques, déclenchant l'activation, en cascade, de nombreuses voies de signalisations (phosphorylations essentiellement).

A l'issue de sa capacitation, le spermatozoïde est une cellule mature et fécondante, ayant acquis les compétences :

- de se déplacer vigoureusement dans le tractus féminin, à l'aide un mouvement hyperactif de type curvilinéaire
- de réaliser la réaction acrosomique
- de se fixer à la zone pellucide et à l'ovocyte

Tous les spermatozoïdes ayant traversé le col utérin n'arrivent pas en une vague uniforme au niveau de l'ovocyte. En effet, des interactions entre des sucres de l'épithélium utérin et des récepteurs membranaires spermatiques permettent de retenir une partie de ces spermatozoïdes et d'inhiber temporairement leur capacitation (réversibilité de la capacitation).

Ce phénomène permet d'augmenter la durée de vie des spermatozoïdes (la durée de vie du spermatozoïde capacité étant plus courte) et la fenêtre de fécondabilité (vagues de spermatozoïdes capacités relâchés dans le 1/3 externe de la trompe).

Ce réservoir spermatique est localisé essentiellement au niveau du col utérin et de l'isthme tubaire.

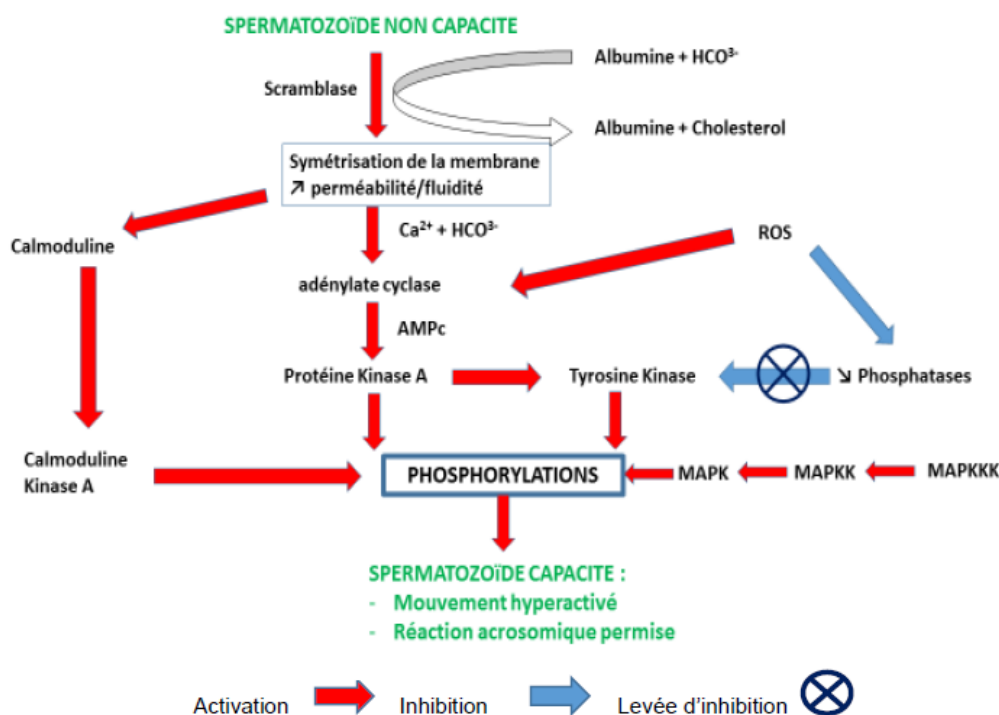


Figure 4 : Signalisation de la capacitation
(thèse d'exercice de Julien Bessonnat, faculté de Médecine de Grenoble, 2015)

2) Fécondation

A proximité du CCO, dans le tiers externe de la trompe, le spermatozoïde capacité effectue sa réaction acrosomique. Cette dernière correspond à l'exocytose de l'acrosome et à la libération de son contenu (nombreuses protéases). Elle permet ainsi au spermatozoïde de traverser le *cumulus oophorus* et la zone pellucide, afin d'atteindre l'ovocyte. C'est un phénomène irréversible et nécessaire puisqu'il permet de dévoiler des récepteurs à la surface de la tête du spermatozoïde pour permettre ensuite sa fixation à la membrane ovocytaire.

Une fois attaché, les membranes des deux gamètes fusionnent et le spermatozoïde délivre son contenu (dont son matériel génétique) à l'ovocyte.

L'entrée d'une enzyme spermatique clé, la phospholipase C zeta, dans l'ovocyte, va entraîner l'apparition d'oscillations calciques internes, initiant ainsi le phénomène d'activation ovocytaire.

Ce processus permet :

- la fin de maturation de l'ovocyte : achèvement de la deuxième division méiotique et expulsion du deuxième GP.
- la réaction corticale : elle correspond à l'exocytose du contenu des granules corticaux sous membranaires, permettant un remodelage de la zone pellucide et un blocage de la polyspermie (pénétration et fécondation d'un ovocyte par plusieurs spermatozoïdes).

Enfin, le rapprochement et la fusion des deux noyaux haploïdes (PN ou pronuclei), appelée syngamie, aboutissent à l'obtention d'une entité unique : le zygote, cellule diploïde à « $2n$ » chromosome (*figure 5*).

Ce sont les stocks protéique et mitochondrial ovocytaires qui permettront d'assurer le développement précoce du futur embryon (jusqu'au troisième jour de développement environ). Le spermatozoïde fournit, quant à lui, son centriole proximal, qui servira à la constitution du fuseau mitotique pour les premières divisions cellulaires.



Figure 5 : Zygote avec 2 GP et 2 PN

3) Développement embryonnaire préimplantatoire

Après la fécondation, le zygote va progresser dans la trompe en direction de l'utérus. Avant de s'implanter, celui-ci va subir des phénomènes de divisions, de différenciation et de réorganisation cellulaires, définissant les différents stades du développement embryonnaire (*figure 6*).

Environ 24 h, 48 h et 72 h après la fécondation, les mitoses s'enchainent et le nombre de blastomères double à chaque division, aboutissant à l'obtention d'un embryon à deux, quatre et huit cellules respectivement : c'est la segmentation (www.embryology.ch).

Au quatrième jour, les cellules, devenues nombreuses (> 16 - 32) dans un espace non distensible délimité par la zone pellucide péri-ovocyttaire, vont commencer à se compacter les unes aux autres et à se polariser avec l'établissement de jonctions serrées : c'est la compaction qui définit le stade morula.

Entre le quatrième et cinquième jour, un influx d'eau dans la morula, via des pompes Na/K ATPase et des aquaporines, va se mettre en place, constituant une cavité centrale appelée blastocèle qui grossira progressivement avec le développement de l'embryon appelé alors blastocyste : c'est la blastulation.

Parallèlement, une polarité cellulaire s'est mise en place, avec d'une part une masse cellulaire interne formant le bouton embryonnaire (futur fœtus) et, d'autre part, des cellules périphériques tapissant le blastocèle et formant le trophoctoderme (futures annexes embryonnaires).

Le blastocyste s'expand progressivement avec la croissance de sa cavité centrale, amincissant alors la zone pellucide qui l'entoure.

Entre le sixième et le septième jour, la zone pellucide amincie finit par se rompre, laissant éclore le blastocyste dans la cavité utérine.

Cette étape est indispensable pour l'interaction entre les cellules trophoblastiques du blastocyste et les cellules endométriales, initiant ainsi l'implantation.

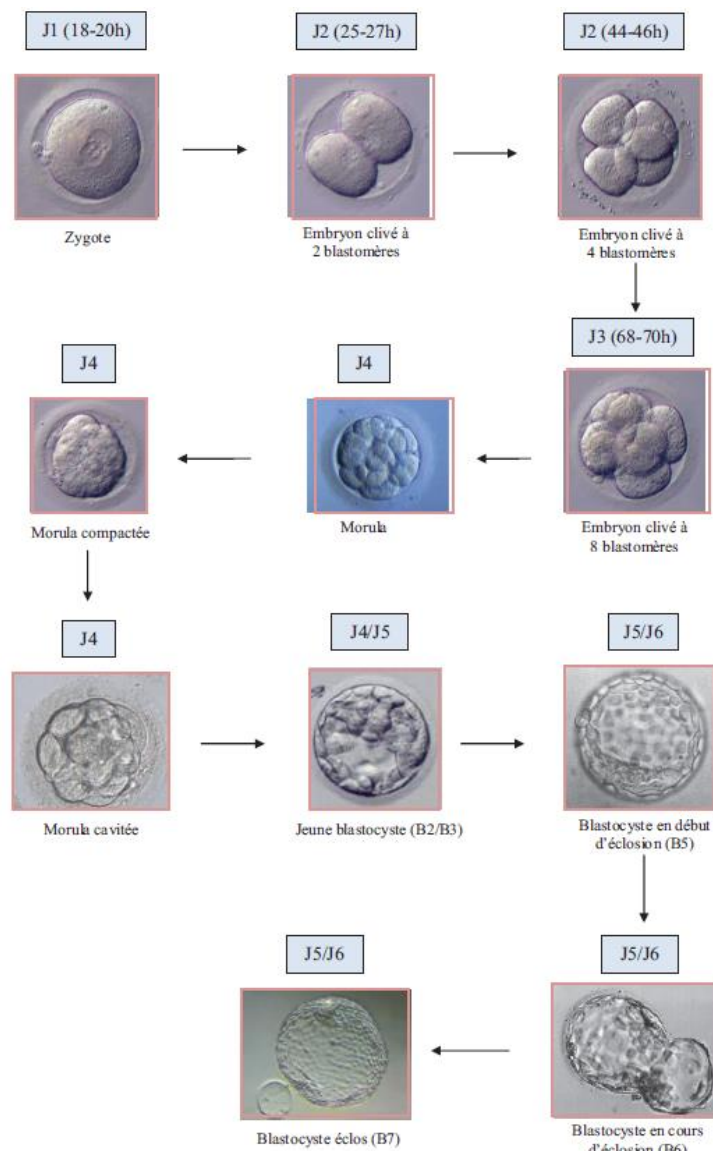


Figure 6 : Phases de développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste (thèse d'exercice de Charlotte Mauroy, faculté de Médecine-Tours, 2017)

4) Environnement utéro-tubaire

a) Généralités

L'influence qu'exerce l'environnement du tractus génital féminin est critique sur de multiples phénomènes physiologiques de la reproduction, allant de la survie et maturation des gamètes, à la fécondation et au développement embryonnaire précoce (*Li and Winuthayanon 2017*).

- **Influence sur les spermatozoïdes :**

Comme vu précédemment, l'environnement utérin, via certaines molécules contenues dans ses sécrétions, joue un rôle crucial dans la capacitation, et donc la maturation, des spermatozoïdes (paragraphe I.1.b).

De son côté, l'environnement tubaire exerce un rôle clé dans le transport et le guidage des spermatozoïdes capités jusqu'au site de fécondation (de l'isthme au tiers externe de la trompe).

Schématiquement, trois mécanismes, impliqués dans ces phénomènes, ont été décrits (*figure 7*) :

- le rhéotactisme : ce mécanisme implique l'action mécanique du fluide tubaire. Les spermatozoïdes capités, arrivant au niveau de l'isthme tubaire, sont capables de se déplacer contre le courant exercé par ce fluide (mouvement hyperactif). Ce phénomène sert de guide pour les faire remonter jusqu'au tiers externe (*Miki and Clapham 2013*).

- le chimiotactisme : il existe un gradient de concentration de diverses molécules entre l'ampoule et l'isthme tubaire. Les spermatozoïdes vont être sensibles à l'existence de ce gradient et vont être attirés vers la région la plus concentrée (tiers externe). Parmi les nombreuses molécules chimio-attractantes décrites, on peut citer notamment la progestérone, sécrétée par les cellules folliculaires du CCO, et certaines cytokines, présentes dans le liquide folliculaire et libérées dans la trompe lors de l'ovulation (*Oren-Benaroya et al. 2008 ; Caballero-Campo et al. 2014*).

- le thermotactisme : comme pour le chimiotactisme, il existe un gradient de température entre l'ampoule et l'isthme tubaire (à peine quelques degrés) (*Hunter 2012*). Les spermatozoïdes sont capables de détecter de toutes petites variations de température et seront donc sensibles à l'existence de ce gradient (*Bahat et al. 2012*). Ce mécanisme a cependant un rôle mineur par rapport aux deux précédents.

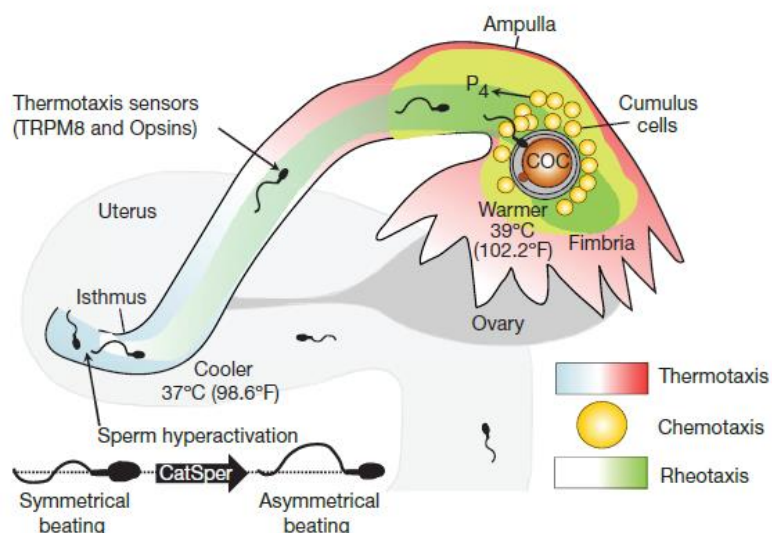


Figure 7 : Influence de l'environnement tubaire sur le transport des spermatozoïdes au site de fécondation. (Li and Winuthayanon 2017)

Inversement, la présence de ces spermatozoïdes a une influence, elle-même, sur l'environnement tubaire. Ce dernier est capable de s'adapter afin, notamment, d'assurer leur protection et de faciliter leur ascension jusqu'au site de fécondation. Par exemple, en présence de spermatozoïdes, la trompe est capable de réguler la concentration en protéines de son fluide, modifiant ainsi sa viscosité, de produire davantage de molécules anti-oxydantes protectrices (Georgiou *et al.* 2005) et de modifier la contractilité de ses cellules musculaires.

Enfin, la présence de certains électrolytes (K^+ , HCO_3^- et Ca^{2+} essentiellement) dans le fluide tubaire et d'un pH alcalin (> 7.2) au niveau du tiers externe de la trompe, vont permettre au spermatozoïde de réaliser sa réaction acrosomique.

- **Influence sur les ovocytes et la fécondation :**

Après l'ovulation, une interaction se met en place entre les cellules épithéliales tubaires et le CCO.

Le glucose du fluide tubaire sera capté et métabolisé par les cellules folliculaires. Ces dernières produiront, secondairement, des substrats énergétiques pour le métabolisme ovocytaire (Sutton-McDowall *et al.* 2010).

Il a été décrit l'existence de protéines, dans le fluide tubaire de souris, impliquées dans la reconnaissance entre les spermatozoïdes et le CCO juste avant la fécondation (arylsulfatase A, sperm adhesion molecule 1) (Bromfield *et al.* 2016).

- **Influence sur le développement embryonnaire précoce :**

Après la fécondation, le jeune embryon est en contact étroit avec le fluide et les cellules épithéliales tubaires, jusqu'à son arrivée dans l'utérus.

L'environnement tubaire lui fournit des conditions optimales de pH, gaz et température pour assurer son développement (*Li and Winuthayanon 2017*).

Cet environnement est caractérisé par la présence :

- d'un taux d'oxygène bas, décrit entre 2 et 8 % (*Fischer et Bavister 1993*). Le développement embryonnaire est optimal dans un environnement hypoxique, où la génération de ROS (reactive oxygen species) et de stress oxydant, délétères pour l'embryon, sont réduits.
- d'une température avoisinant les 37 °C, avec l'existence possible d'un gradient entre l'ampoule et l'isthme utérin (0.2 à 1.6 °C plus froid au niveau de l'isthme) (*Hunter 2012 ; Grinsted et al 1985*). La mesure exacte de la température dans le tractus féminin reste cependant imprécise car soumise à l'existence de difficultés méthodologiques (moment de la journée, méthode et site de mesure, etc.).
- d'un pH optimal pour le développement et la survie embryonnaires. La valeur de ce pH varie entre les différentes régions de la trompe, jusqu'à l'utérus (détaillé dans le paragraphe I.4.b).

Le fluide tubaire est essentiellement composé de molécules nutritives et protectrices pour l'embryon (*Li and Winuthayanon 2017*).

On y retrouve notamment (*figure 8*) :

- des substrats énergétiques : essentiellement des acides carboxyliques (pyruvate et lactate) et du glucose et, dans une moindre mesure, certains acides aminés et acides gras. Jusqu'au troisième jour de développement, l'embryon utilise le pyruvate et le lactate pour son métabolisme énergétique. Au-delà du troisième jour, avec l'activation de son génome et de ses mitochondries, la morula et le blastocyste utiliseront essentiellement le glucose comme substrat énergétique (*Leese 2008, 2012*).
- des électrolytes : les ions potassium, sodium, chlore et bicarbonates y sont retrouvés en quantité importante. Ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions, dont le métabolisme embryonnaire, la régulation du pH et de l'osmolarité tubaires, etc. (*Leese 1988*).
- des acides aminés : non essentiels (utilisés par les stades embryonnaires précoces) et essentiels (stades tardifs). Ils ont de multiples rôles : antioxydant, régulation de l'osmolarité, métabolites pour la synthèse de protéines, substrat énergétique, tampon du pH intracellulaire, etc. (*Wale and Gardner 2016*).
- des facteurs de croissance : EGF (epidermal growth factor), TGF (transforming growth factor), IGF (insulin-like growth factor), etc. Ils ont des fonctions trophiques sur l'embryon et protectrice contre l'apoptose.

- des macromolécules : surtout de l'albumine, de la transferrine et des immunoglobulines de type G. L'albumine a de nombreux rôles protecteurs sur l'embryon (antioxydant, stabilisateur de membrane, régulateur osmotique, etc.).
- des hormones : estradiol et progestérone. L'estradiol aurait une fonction protectrice pour l'embryon vis-à-vis du système immunitaire féminin.

Parallèlement à son développement, l'embryon se déplace continuellement et lentement au sein du fluide tubaire, de la région ampullaire jusqu'à l'entrée de la cavité utérine. Son transport est facilité par le battement des cils vibratiles des cellules épithéliales, la contraction des cellules musculaire lisses et le mouvement sortant, physiologique, du fluide tubaire. Ces mécanismes de transport embryonnaire sont dépendants des concentrations locales en estradiol et progestérone (Li and Winuthayanon 2017).

Les déchets métaboliques de l'embryon sont facilement éliminés grâce à sa proximité avec les cellules épithéliales tubaires, puis par le réseau vasculaire féminin.

Enfin, le fluide tubaire jouerait un rôle dans la régulation épigénétique de l'embryon au cours de son développement (Li and Winuthayanon 2017).

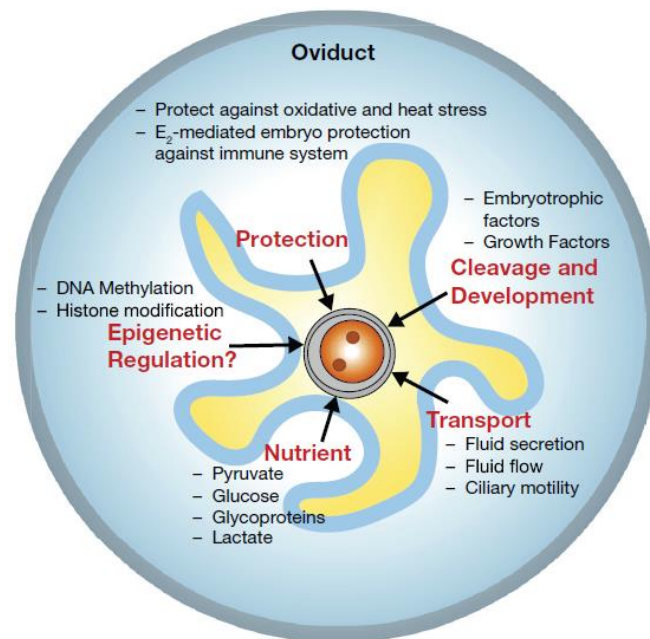


Figure 8 : Influence de l'environnement tubaire sur l'embryon préimplantatoire. (Li and Winuthayanon, 2017)

b) Le pH

La valeur du pH interne (pHi), ovocytaire et embryonnaire, est directement influencée par celle du pH extérieur (pHe), retrouvée notamment dans les trompes et dans l'utérus. Une parfaite homéostasie de ce pHi est indispensable car celui-ci est impliqué dans de nombreuses fonctions et voies métaboliques cellulaires : réactions enzymatiques, fonctionnement des mitochondries, division et différenciation cellulaires, polymérisation du cytosquelette d'actine, signalisation calcique, synthèse d'ADN, etc. (Squirrell et al. 2001, Busa et al. 1986).

La valeur optimale, autour de laquelle le pHi doit être maintenu, varie légèrement en fonction du stade de développement (figure 9). Celle-ci est un peu plus basse pour les ovocytes que pour les embryons, mais serait d'environ 7.1 (Phillips et al. 2000).

Cell stage	pHi
Germinal vesicle-intact oocyte	7.04 ± 0.07
Metaphase I oocyte	7.03 ± 0.04
Metaphase II oocyte	6.98 ± 0.02
2-8-cell embryo	7.12 ± 0.01

Figure 9 : Valeurs optimales du pHi des ovocytes et embryons humains (adapté de Phillips et al. 2000)

En cas de pHi éloigné de cette valeur, des conséquences irréversibles sur le développement et la survie des ovocytes et embryons peuvent survenir :

- au stade ovocytaire : cela aurait un effet délétère sur la polymérisation du cytosquelette d'actine, et entraînerait donc des anomalies de formation et de séparation du fuseau méiotique. Ces perturbations favoriseraient la survenue d'aneuploïdie, voire d'arrêt méiotique (Swearman et al. 2018).
- aux stades embryonnaires précoces : une perturbation de la localisation et du fonctionnement des mitochondries a été rapporté (Squirrell 2001 ; Bavister and Squirrell 2000). De plus, une légère augmentation de 0.1 à 0.2 point du pHi au-dessus de 7.2 suffirait à activer prématurément la glycolyse (via l'augmentation de l'activité de la phosphofruktokinase) et entraîner un arrêt de développement embryonnaire (Edwards et al. 1998, Lane and Gardner 2000).
- aux stades embryonnaires plus tardifs : un pHi inapproprié altérerait les pompes Na/K ATPase, entraînant un défaut de formation du blastocèle et donc des anomalies de blastulation embryonnaire (Barr et al. 1998 ; Watson et al. 2001).

L'ovocyte, puis l'embryon, doit donc maintenir son pHi le plus stable possible pour son développement. Or, celui-ci évolue dans un environnement dynamique où la valeur du pH externe varie, de la région ampullaire de la trompe à la cavité utérine. En effet, au vu des différentes données de la littérature, il ressort que le pHe retrouvé

dans les trompes de plusieurs mammifères serait plus basique que celui retrouvé dans l'utérus (*figure 10*) (*Hugentobler et al. 2004, Iritani et al. 1969, Yedwab et al. 1976, Fraser et al. 1973, Shalgi et al. 1972*).

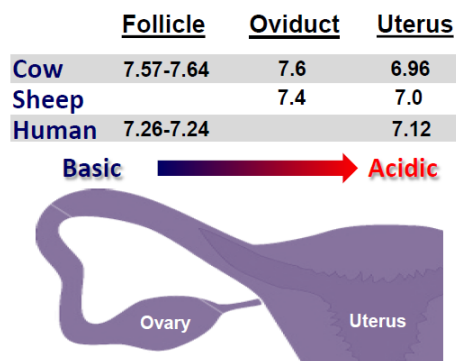


Figure 10 : Variation du pHe dans les follicules, trompes et utérus chez différents mammifères
(Webinar: Practical pH for the IVF Lab, Jason Swain 2013)

Il a été rapporté que les ovocytes et embryons étaient capables de s'adapter à cet environnement de pH changeant, sans anomalies au niveau de leur développement, lorsque la valeur du pH extérieur était comprise entre 7.0 et 7.4 (*John and Kiessling 1998 ; Lane et al. 1998*). En effet, dans cet intervalle de pHe, ils possèdent des outils pour stabiliser leur pHi autour de 7.1. Le premier mécanisme d'adaptation est assuré par des systèmes tampons intracellulaires (certains acides aminés par exemple comme l'aspartate) qui agissent rapidement pour essayer de stabiliser le pHi. Ces systèmes sont rapidement dépassés et le relai est pris plus fortement par des échangeurs ioniques. Ces derniers, au nombre de trois (*figure 11*), ont été identifiés et étudiés avant les années 2000. Ils possèdent des seuils d'activation dépendants de la valeur du pHi (*Baltz 2012, Dale et al. 1998, Barr et al. 1998, Lane et al. 1998-1999, Zhao et al. 1995, Phillips et al. 2000, Edwards 1998*) :

- le canal Na^+/H^+ : c'est le principal acteur pour lutter contre un excès d'acidification intracellulaire en externalisant des ions H^+ : son set point d'activation serait de 6.8.
- le canal $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^- \text{ Na}^+$ dépendant : en faisant entrer des ions HCO_3^- dans la cellule, il aide également à stabiliser le pHi en cas d'acidification intracellulaire : set point d'activation de 7.0.
- le canal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$: il tend, quant à lui, à acidifier la cellule grâce à un efflux extracellulaire d'ions HCO_3^- : set point d'activation autour de 7.2-7.3.

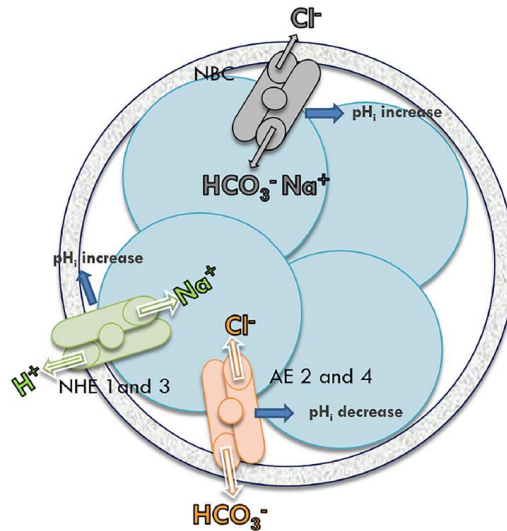


Figure 11 : Régulation du pHi embryonnaire par les échangeurs ioniques (Gatimel et al. 2020)

Il a été montré que ce sont les ovocytes et les embryons aux stades précoces, plus précisément avant activation du génome embryonnaire (troisième jour), qui sont le plus sensibles aux perturbations de leur environnement (Zander et al. 2006), et notamment aux variations du pHe (figure 12).

En effet, ceux-ci régulent moins bien leur pHi que les stades plus tardifs, en particulier en cas d'excès d'acidification, car leurs canaux Na⁺/H⁺ et HCO₃⁻/Cl⁻ Na⁺ dépendant sont beaucoup moins fonctionnels (Edwards et al. 1998 ; Zander-Fox et al. 2008). Ils possèdent, néanmoins, les outils nécessaires pour évoluer dans l'environnement tubaire, plus alcalin.

Les embryons aux stades tardifs (morula et blastocyste) régulent, eux, mieux leur pHi dans un environnement plus acide, retrouvé notamment lorsqu'ils se rapprochent de l'utérus. Ce phénomène est expliqué par une meilleure expression des échangeurs ioniques correspondants (canaux Na⁺/H⁺ et HCO₃⁻/Cl⁻ Na⁺ dépendant) et par la mise en place, à ces stades, de jonctions serrées entre les cellules. Une plus grande sensibilité à un environnement basique est cependant à noter chez les morulas et blastocystes par rapport aux stades précoces (Edwards et al. 1998, Swain 2010).

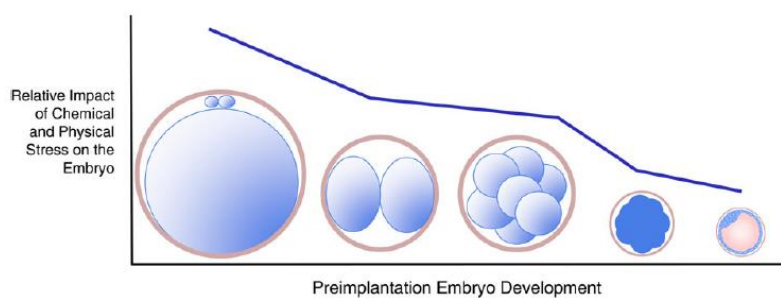


Figure 12 : Sensibilité stade-dépendant de l'ovocyte et de l'embryon à leur environnement. (Wale and Gardner 2016)

II) Fécondation in vitro

L'objectif de la fécondation in vitro (FIV) est de reproduire, en laboratoire, toutes les étapes nécessaires à la rencontre des gamètes et la culture embryonnaire jusqu'au transfert d'embryon dans l'utérus.

Elle permet de court-circuiter de nombreuses étapes présentes lors de la fécondation physiologique, lorsque cette dernière est rendue difficile voire impossible (infertilité d'origine tubaire par exemple).

Un processus classique de FIV est décomposé en plusieurs étapes importantes (*figure 13*) : la stimulation ovarienne, la récupération des gamètes féminins et masculins, la mise en fécondation, la culture embryonnaire et le transfert ou congélation embryonnaires.

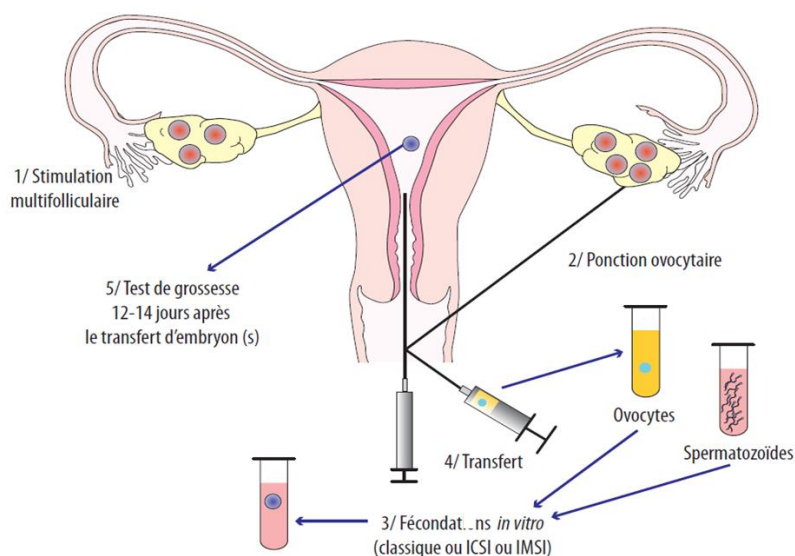


Figure 13 : Différentes étapes lors d'un processus de FIV (Robin et Catteau-Jonard. Med Clin Endoc Metabol 2013)

1) Stimulation ovarienne

L'objectif essentiel de la stimulation ovarienne lors d'une FIV est de recruter plusieurs follicules mûrs, afin de récupérer plusieurs ovocytes matures susceptibles d'être fécondés : on parle de stimulation ovarienne multifolliculaire. En effet, l'obtention de plusieurs ovocytes permet d'augmenter les chances d'avoir un ou plusieurs embryons de bons potentiels à transférer (en un ou plusieurs transferts), et d'accroître ainsi les chances de grossesses cumulées.

La surveillance du traitement hormonal doit permettre d'éviter l'hyperstimulation ovarienne, complication du traitement potentiellement grave (risques augmentés de manifestations thromboemboliques diverses, d'ascite, d'insuffisances pulmonaire, cardiaque ou rénale, etc.).

Différents protocoles de stimulations existent selon les produits utilisés et la chronologie d'administration. Schématiquement, un protocole classique de stimulation multi-folliculaire comprend les trois étapes suivantes (*figure 14*) :

- **Stimulation de la folliculogénèse :**

Elle est réalisée par une injection quotidienne de gonadotrophine exogène (FSH, avec ou sans LH associée) à J1 du cycle (correspondant au premier jour des règles). Cette injection de FSH exogène, à dose supra-physiologique, permet le recrutement, la sélection et la maturation finale de plusieurs follicules, et non uniquement d'un seul follicule comme rencontré physiologiquement (partie 1.I.1.a) : elle permet donc d'inhiber le phénomène de dominance folliculaire. Selon le protocole mis en œuvre, un blocage hypophysaire par administration d'estrogène exogène, sur les quelques jours de la fin du cycle précédent, est possible (cela permet de « prendre le contrôle » sur les ovaires en début de stimulation, en bloquant l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien grâce à un rétrocontrôle négatif).

- **Blocage de l'ovulation spontanée :**

Quelques jours après le début de la stimulation, un agoniste, ou un antagoniste, de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) est utilisé pour bloquer et empêcher un pic prématuré de LH, qui déclencherait une ovulation prématurée, avec pertes de tous les ovocytes dans les trompes.

- **Déclenchement de l'ovulation :**

Il se réalise par l'injection, faite à heure précise, d'une molécule qui va reproduire artificiellement le pic physiologique de LH (molécule constituée d'Human Chorionic Gonadotropin, HCG, en général). Cela va initier le processus d'ovulation, entraînant la fin de la maturation des ovocytes et leur détachement progressif du follicule.

Parallèlement à l'étape de la stimulation folliculaire, un contrôle de l'efficacité et de la tolérance du traitement (afin de prévenir l'hyperstimulation ovarienne notamment) est systématiquement réalisé, en général à partir de J6 (*figure 14*).

Il est effectué par un double monitoring :

- hormonal : dosage du taux sanguin de 17- β -estradiol essentiellement, directement sécrétée par les cellules folliculaires et proportionnel au nombre et à la taille des follicules recrutés par le traitement.
- échographique par voie endo-vaginale : évaluation du nombre et de la taille des follicules recrutés, et de l'épaisseur de l'endomètre.

Le déclenchement de l'ovulation est décidé quand certains critères de surveillance sont réunis : critères variables d'un centre et d'un protocole à un autre, mais, en général, il faut observer au moins trois à quatre follicules mûrs (d'au moins 14 mm de diamètre) à l'échographie et une oestradiolémie d'environ 250 à 300 pg/mL/follicules mûrs.

Un taux sanguin d'œstradiol trop élevé, supérieur à 3 500 pg/mL, doit faire craindre un syndrome d'hyperstimulation ovarienne (décrit ci-dessus). Au contraire, une oestradiolémie trop basse associée à un trop faible nombre de follicules mûrs recrutés, augmentent le risque d'échec de la tentative de FIV (dose du traitement inadaptée ou patiente « mauvaise répondeuse ») : dans cette situation, la décision d'arrêt du processus de stimulation peut être décidée.

Enfin, un endomètre de taille, et/ou d'échogénicité, discordant avec le jour de stimulation, sera inadéquat pour une éventuelle nidation. Dans ce cas, la congélation de la cohorte embryonnaire pourra être recommandée.

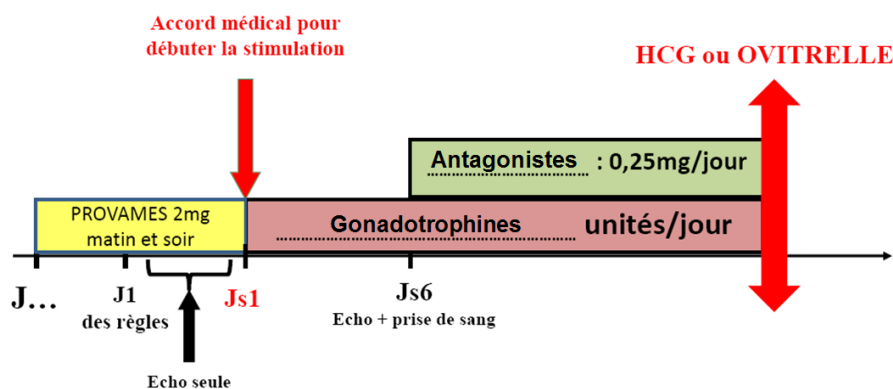


Figure 14 : Exemple d'un protocole antagoniste programmé de stimulation ovarienne (Guivarch'Leveque et al. Gynecol obstet Fertil 2010)

2) Récupération, préparation et rencontre des gamètes

a) Récupération des ovocytes

Le prélèvement ovocytaire est effectué sous anesthésie générale ou anesthésie locale, par ponction transvaginale échoguidée, 34 à 36 h après le déclenchement de l'ovulation en générale (CNGOF item 30 : AMP 2006). Une ponction réalisée trop précocement, après ce déclenchement, peut faire récolter que des ovocytes immatures, non utilisables par la suite car non fécondables. Au contraire, une ponction réalisée trop tardivement expose au risque d'ovulation prématurée et donc de ne récupérer aucun ovocyte (ponction blanche).

Chaque follicule mûr est ponctionné à l'aide d'une aiguille. Le liquide folliculaire, avec les ovocytes qu'il contient, est aspiré dans des tubes chauffés à 37°C. Ces derniers sont ensuite acheminés rapidement au

laboratoire. Les complexes cumulo-ovocytaires y sont recherchés, sous loupe binoculaire, récoltés dans un milieu de culture et placés en incubation à 37°C en attendant la fécondation in vitro à proprement parler.

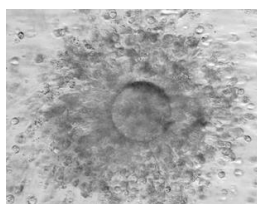


Figure 15 : Complexe cumulo-ovocyttaire

b) Préparation des spermatozoïdes

Parallèlement à la récolte des ovocytes, les spermatozoïdes sont récupérés au laboratoire, le plus souvent par masturbation le jour de la ponction folliculaire, puis préparés pour la fécondation in vitro.

Les spermatozoïdes utilisés peuvent également être des spermatozoïdes congelés plusieurs jours avant la ponction, pour différentes indications (obtenus après éjaculation ou biopsie testiculaire/épididymaire), puis décongelés et préparés le jour de la tentative (*CNGOF item 30 : AMP 2006*).

La méthode de préparation des spermatozoïdes la plus couramment utilisée, dans les centres d'AMP en France, est la préparation sur gradient de densité. Cette technique va reproduire, in vitro, toutes les étapes de maturation que subissent les spermatozoïdes, in vivo, lors de leur traversée dans les voies génitales féminines (capacitation) : retrait des facteurs inhibiteurs séminaux et action de facteurs capacitants (paragraphe I.1.b).

En pratique, elle consiste à déposer un certain volume de spermatozoïdes sur un milieu visqueux formé d'un gradient de couches de densité croissante (*figure 16*). L'ensemble de la préparation est centrifugé afin de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal et d'autres composants éventuellement présents. Le culot de centrifugation obtenu est remis en suspension dans un milieu enrichi en facteurs capacitants (albumine, Ca²⁺, etc), puis centrifugé à nouveau, permettant de récupérer un culot final contenant les spermatozoïdes les plus mobiles, capacités et donc féconds.

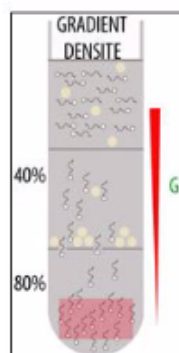


Figure 16 : Préparation des spermatozoïdes sur gradient de densité
(site FivFrance.com)

c) FIV et devenir des embryons

Une fois les deux gamètes récupérés et préparés, deux techniques de fécondation in vitro sont alors possibles :

- **la FIV conventionnelle (FIVc)** : c'est la technique la plus ancienne, qui consiste à mettre en fécondation tous les complexes cumulo-ovocytaires récupérés à la ponction ovarienne avec une suspension de spermatozoïdes capotés (nombre calibré de spermatozoïdes mobiles progressifs, en général plusieurs milliers par CCO).

- **la FIV avec injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (FIV-ICSI)** : cette technique est réservée pour les cas d'altérations sévères des paramètres spermatiques et/ou d'antécédent d'échec de fécondation en FIVc. Elle consiste à injecter un seul spermatozoïde, choisi par l'opérateur selon des critères morpho-cinétiques, par ovocyte mature. Ce geste fin est réalisé grâce à un système de micro-injection. La FIV-ICSI est précédée d'une étape de décoronisation des CCO (les cellules folliculaires résiduelles, autour de l'ovocyte, sont éliminées), afin d'apprécier l'état de maturité des ovocytes.

Cette étape terminée, les futurs zygotes sont déposés dans des boîtes de culture, baignant dans un milieu nutritif, et placés dans des incubateurs, contrôlés en gaz et en température : c'est le début de la culture embryonnaire. De nombreux paramètres, au sein du laboratoire, sont à maîtriser afin d'optimiser les conditions de culture et permettre ainsi le meilleur développement embryonnaire possible (détaillé en partie 2).

Les zygotes sont évalués le lendemain de la mise en fécondation pour apprécier la réalité de cette dernière et pour détecter d'éventuelles anomalies (*CNGOF item 30 : AMP 2006*).

Puis, une nouvelle évaluation des embryons est réalisée habituellement aux deuxième ou troisième jours de culture, où ils sont classés selon des critères morphologiques (stade clivé). Cette évaluation est importante puisqu'elle permet de statuer sur leur devenir : transfert d'un ou deux embryons à ce stade, prolongation de la culture quelques jours de plus (jusqu'aux cinquième ou sixième jours), congélation ou destruction de l'embryon.

Lorsqu'un transfert embryonnaire est décidé, le ou les embryons choisis sont sortis de leur boîte de culture, montés dans un cathéter de transfert, puis déposés, sous contrôle échographique, dans l'utérus. Un dosage plasmatique des β -HCG sera réalisé par la suite pour surveiller l'apparition d'une grossesse débutante. Celui-ci est à faire au minimum dix jours après le déclenchement de l'ovulation (en cas de déclenchement par de l'Ovitrelle) : un dosage réalisé trop précocement (avant dix jours) pourrait entraîner un faux positif.

Les embryons surnuméraires (non transférés) de bonne évolution peuvent être congelés en vue de leur transfert ultérieur. Lorsque l'endomètre, ou l'état de la patiente, ne permettent pas un transfert immédiat, la congélation de tous les embryons de bonne évolution sera directement recommandée.

Partie 2 : Culture embryonnaire

Pour la culture embryonnaire, la ligne directrice est de se rapprocher le plus possible des conditions environnementales auxquelles l'embryon est exposé in vivo, dans les trompes et dans l'utérus (bien que celles-ci ne soient pas encore toutes élucidées) (*Consensus du Caire 2020*).

Cependant, dans les laboratoires d'AMP, de nombreux paramètres sont une source de stress potentiel pour le développement embryonnaire, et sont donc à maîtriser (*figure 17*). Parmi eux, on peut citer la qualité de l'air au sein du laboratoire, la luminosité, l'atmosphère présent dans les incubateurs, la composition des milieux de culture, etc. (*Wale and Gardner 2016*). Comme vu précédemment, une attention particulière doit être portée sur les conditions de culture des ovocytes et des jeunes embryons, car ce sont eux les plus sensibles aux variations de leur environnement (partie 1, paragraphe I.4). De plus, contrairement à l'environnement dynamique retrouvé dans les trompes, l'embryon au laboratoire évolue dans un environnement le plus souvent statique où certains de ses déchets métaboliques toxiques peuvent s'accumuler au fil des jours (*Wale and Gardner 2016*) : cela peut avoir un impact négatif tout au long de la culture et notamment pour les stades embryonnaires plus tardifs (morula et blastocystes). Un effet synergique cumulatif, de plusieurs facteurs de stress, est possible et sera encore plus délétère sur le développement embryonnaire (*Awonuga et al. 2013*).

Il a été montré que la présence de certains de ces facteurs, au laboratoire, peuvent influencer les taux de réussite en AMP (taux de fécondation, développement embryonnaire, grossesse) (*Wale and Gardner 2016*). Ainsi, des conditions de culture sub-optimales peuvent diminuer les taux de succès d'un laboratoire d'AMP.

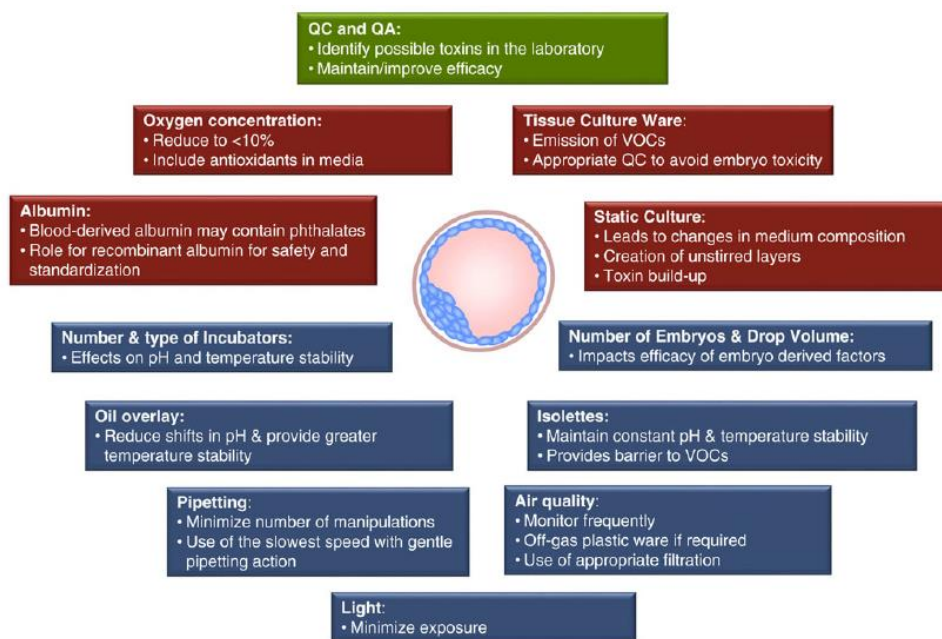


Figure 17 : Différents paramètres physico-chimiques à maîtriser en culture embryonnaire (Wale and Gardner 2016)

D'autre part, l'importance de maîtriser les conditions de culture est renforcée par la pratique croissante, dans les centres d'AMP, de la culture prolongée. Cette dernière consiste à garder les embryons en culture quelques jours de plus, jusqu'aux cinquièmes ou sixièmes jours, pour pouvoir obtenir et transférer des blastocystes. En effet, ces derniers possèdent un taux d'implantation significativement plus élevé que les embryons clivés, quel que soit l'âge féminin (*SART 2017*).

Les avantages de la culture prolongée sont nombreux (*Consensus du Caire 2020*) : on peut citer, notamment, une meilleure sélection des embryons, au-delà de l'activation de leur génome (troisième jour) ; une meilleure synchronisation avec l'endomètre en cas de transfert (pour rappel, in vivo, l'embryon entre dans la cavité utérine au stade blastocyste) ; un transfert réalisé plus à distance d'une hyperoestrogénie (présente en post-stimulation), etc. Le principal risque de cette stratégie est qu'aucun embryon n'atteigne le stade de blastocyste, entraînant donc une absence de transfert pour la tentative.

La réalisation d'une culture prolongée est, cependant, plus complexe et plus onéreuse pour le laboratoire car l'obtention de blastocystes nécessite des conditions de cultures spécifiques : entre autres, des besoins nutritifs (milieu de culture) différents par rapport aux embryons clivés (*Consensus du Caire 2020*).

I) Paramètres à maîtriser

1) Qualité de l'air

Au sein d'un laboratoire d'AMP, différents composants, présents dans l'air (volatile organic compounds ou VOC, microorganismes, particules, etc), peuvent nuire à la culture embryonnaire (*Legro et al. 2010 ; Perin et al. 2010*). Il est donc primordial de maîtriser la qualité de l'air en FIV (*Thomas T 2012*).

La présence de VOC dans l'atmosphère du laboratoire a bien été documentée (*Cohen et al. 1997-1998*) et certains de ces composés auraient un impact négatif sur le développement embryonnaire en diffusant dans le milieu de culture (*Khoudja et al. 2013*). C'est une grande famille de molécules, comprenant, entre autres : le formaldéhyde, le toluène, le benzène, l'acétone, etc. Leurs sources d'émission sont également variées : emballages de consommables du laboratoire, parfum, solution hydro-alcoolique, déodorants, incubateurs, etc.

Des mesures préventives doivent être mises en place au laboratoire afin de réduire le plus possible leur présence (utilisation de systèmes de filtration d'air anti-VOC, éviction des déodorants, parfum et solution hydro-alcoolique, etc.) (*Mortimer et al. 2018*).

Des polluants atmosphériques extérieurs, comme certains gaz (O₃, NO₂, SO₂), ou certaines petites particules (d'origine métallique, chimique, etc.), peuvent s'introduire dans le laboratoire. Ils ont été décrits comme potentiellement néfastes sur le développement et l'implantation embryonnaires (*Perin et al. 2010*).

L'hygrométrie, au sein du laboratoire, doit être maintenue autour d'un certain taux fixe. En effet, une trop forte humidité expose à un risque accru de développement de moisissures. Au contraire, un environnement trop sec est inconfortable pour le personnel du laboratoire et aura tendance à accélérer l'évaporation des milieux de culture, modifiant ainsi leur osmolarité et pouvant donc avoir un impact sur le développement embryonnaire (*Mortimer et al. 2018*).

Mortimer et al. (2018) ont établis des recommandations sur la qualité de l'air au sein d'un laboratoire d'AMP, on peut citer par exemple :

- une concentration de VOC inférieure à 500 µg/m³, dont moins de 5 µg/m³ pour les aldéhydes
- une concentration en particules (d'une certaine taille) inférieure à 352 000/m³
- une concentration en microorganismes inférieure à 10 CFU/m³ (unité formant colonie)
- la présence d'une surpression idéale de +38 à +50 Pa
- une température ambiante entre 20 et 24 °C
- un taux d'humidité relative dans l'air entre 40 et 45 %

2) Luminosité

Contrairement au tractus génital féminin, les sources lumineuses, dans un laboratoire d'AMP, sont omniprésentes car nécessaires, variées (lampes classiques, microscopes) et peuvent occasionner du stress embryonnaire (*Pomeroy and Reed 2013*).

Les données animales sont en faveur d'un impact négatif d'une forte luminosité sur le développement embryonnaire (*Oh et al. 2007*), soit directement sur des composants cellulaires, soit indirectement par photo-oxydation de l'huile de recouvrement ou de certains composés du milieu de culture (acides aminés) (*Otsuki et al. 2007-2009 ; Li et al. 2014*). L'intensité lumineuse la plus délétère est celle possédant une faible longueur d'onde, en dessous de 510 nm (vert, bleu et ultraviolet surtout) (*Boon et al. 2010*).

Au laboratoire, lors de l'observation ou la manipulation des embryons, il est nécessaire d'utiliser des filtres sur les microscopes pour bloquer les ultraviolets. De même, l'utilisation de luminosités de faible intensité est recommandée pour limiter le stress embryonnaire (au-dessus de 600 nm de longueur d'onde, vers le « rouge ») (*Consensus du Caire 2020*).

Les nouveaux incubateurs de type time-lapse permettent une observation dynamique et en continue des embryons, en les maintenant dans un environnement clos et maîtrisé pendant toute la durée de la culture. Leur observation est assurée, habituellement, grâce à une exposition lumineuse de courte durée et de faible intensité (entre 625 et 635 nm). Ces avantages pourraient permettre d'optimiser le développement embryonnaire (*Chen et al. 2013*).

3) Incubateurs

Les incubateurs sont certainement les équipements les plus critiques dans un laboratoire de FIV car ils centralisent plusieurs paramètres à maîtriser : température, gaz, etc. (développés ci-dessous).

Le choix du type d'incubateur et leur gestion sont essentiels afin d'optimiser la culture embryonnaire (*Swain 2015*). Plusieurs types d'incubateurs existent sur le marché, différents par leur taille, leur composition en gaz, leur autonomisation, etc. L'utilisation d'incubateurs tri-gaz (délivrant des taux de 5 % d'O₂, 5-6 % de CO₂ et 89-90 % de N₂) dans les laboratoires de FIV s'est considérablement développée au cours des dernières années. En effet, du fait d'un plus faible taux d'O₂ délivré par rapport aux incubateurs classiques, ils apportent de meilleures conditions atmosphériques pour l'embryon. Ils représentent, cependant, un coût supplémentaire pour le laboratoire (essentiellement en lien avec la consommation et la logistique autour de l'azote) (*Consensus du Caire 2020*). Il est important que le laboratoire dispose d'un nombre approprié d'incubateurs pour éviter les répétitions d'ouverture/fermeture de ceux-ci, car délétères sur le développement embryonnaire et le taux de blastulation (*Consensus du Caire 2020*).

a) Température

Comme vu précédemment, les données animales montrent que la température dans les trompes se situerait aux alentours de 37 °C, avec cependant des incertitudes quant à sa valeur exacte (facteurs de variabilité existants sur sa mesure) (partie 1, paragraphe I.4.a).

Pour la culture embryonnaire, il est recommandé de maintenir une température constante de 37 °C dans les incubateurs afin de se rapprocher le plus possible des conditions supposées retrouvées dans les trompes. Cette température doit également être maintenue stable, autour de cette valeur, lors de la sortie des ovocytes et des embryons pour leur observation ou leur manipulation (*Consensus du Caire 2020*).

En effet, il a été décrit des dégâts ovocytaires et embryonnaires irréversibles (fuseaux méiotique et mitotique, chromosomes, etc.) causés par une température de culture trop basse (inférieure à 30°C) et pendant une longue durée (*Johnson et al. 1988*). Ces phénomènes avaient un impact négatif certain sur les taux de fécondation, de développement embryonnaire et de grossesse (*Wang et al. 2001-2002*). De plus, des études ont montré la supériorité d'une culture embryonnaire à 37 °C versus 36 ou 36.5 °C sur les taux de clivage à J3 et de

blastulation à J5, sans différence significative cependant sur les taux d'aneuploïdie et d'implantation (*Hong et al. 2014 ; Fawzy et al. 2018*).

Dans l'autre sens, une température supérieure à 37 °C, même pendant une courte durée, est capable de perturber de manière irréversible la 2^{ème} division méiotique de l'ovocyte et donc son potentiel fécondant (*Sun et al. 2004*).

En cas de variations de température au cours de la culture, on aura une meilleure tolérance pour des températures légèrement en dessous de 37 °C plutôt que légèrement au-dessus (*Consensus du Caire 2020*). En effet, la thermo tolérance des ovocytes et jeunes embryons, notamment, est meilleure pour des températures légèrement inférieures (*Leese et al. 2008*).

Au laboratoire, il est donc primordial maîtriser ce paramètre critique dans les incubateurs (surveillance métrologique avec établissement de bornes alertes), mais également de disposer de hottes et platines chauffantes lors de la sortie des embryons (*Consensus du Caire 2020*).

b) Taux d'oxygène

Comme vu dans la partie 1, l'ovocyte et l'embryon semblent évoluer dans un environnement tubaire où le taux d'O₂ est compris entre 2 et 8 % (paragraphe I.4.a).

Pour la culture embryonnaire, afin de se rapprocher de ces conditions hypoxiques, un taux d'O₂ de 5 % est recommandé actuellement dans les incubateurs (*Consensus du Caire 2020*). Les incubateurs de type tri-gaz remplissent ces conditions et sont capables de fournir un environnement d'oxygène optimisé pour le développement embryonnaire. Leur utilisation croissante dans les laboratoires de FIV se fait au détriment d'incubateurs plus classiques, fournissant un taux d'O₂ atmosphérique (autour de 20-21 %).

En effet, de nombreuses études animales et humaines, ont montré la nette supériorité d'un taux de 5 %, versus un taux atmosphérique d'O₂, sur les taux de clivage, blastulation, implantation, grossesse et naissance vivante (*Edwards et al. 1970, Karagenc et al. 2004, Meintjes et al. 2009, Bontekoe et al. 2012, Nastri et al. 2016*).

Pour aller plus loin, Kaser et al. (2016) ont rapporté un meilleur taux de blastulation pour les embryons exposés à un environnement encore plus hypoxique (autour de 2 % d'O₂ versus 5 %), à partir du troisième jour de culture. Physiologiquement, ces résultats pourraient être expliqués par le fait que l'environnement utérin serait plus hypoxique que l'environnement tubaire (l'embryon arrive dans l'utérus au stade blastocyte), et que la glycolyse, principale voie métabolique énergétique utilisée à partir du stade morula, serait plus pourvoyeuse de stress oxydant à 5 % d'O₂ qu'en dessous (*Morin 2017*). Ces données sont cependant contradictoires avec une autre étude (*Fawzy et al. 2017*).

c) Osmolarité du milieu, humidité et huile de recouvrement

Le maintien d'une certaine osmolarité du milieu de culture, entre 255 et 295 mOsm/kg, est primordial pour un bon développement embryonnaire (*Swain et al. 2012*).

En effet, plusieurs études ont montré qu'une hyperosmolarité du milieu, supérieure à 350 mOsm/kg, était mal tolérée par l'embryon et pouvait entraîner un arrêt de son développement (*Baltz 2012*).

La principale cause d'une élévation de l'osmolarité est l'évaporation du milieu, qui se produit naturellement en culture embryonnaire dans des incubateurs chauffés à 37°C. Afin de limiter le plus possible cette évaporation, une certaine humidité doit régner au sein des incubateurs. Il a, en effet, été rapporté un plus grand bénéfice d'un environnement humide par rapport à un environnement sec pour la culture embryonnaire (*Fawzy et al. 2017*, *Albert et al. 2018*).

Cependant, une trop grande hygrométrie au sein des incubateurs est à éviter car elle favorise le développement de moisissures, délétères pour le développement embryonnaire (*Geraghty et al. 2014*).

Pour la culture embryonnaire, la tendance actuelle est d'incuber des volumes de milieux de plus en plus réduits (20 à 50 µL). Ces derniers s'évaporeront plus rapidement au cours de la culture et, donc, l'impact sur l'osmolarité sera plus important (*Wale and Gardner 2016*).

L'utilisation d'huile de recouvrement sur les milieux incubés apparaît alors essentielle pour limiter cette évaporation et donc les variations osmotiques. Différents types d'huiles sont disponibles sur le marché et celles-ci sont sélectionnées en fonction de leur viscosité, mais les plus utilisées sont les huiles minérales (Paraffin).

Il est indispensable de stocker ces huiles à l'abri de la lumière, et à + 4°C, afin de prévenir la photo-oxydation de certains de ses composés (stéroïdes notamment), eux-mêmes embryotoxiques (*Wale and Gardner 2016*).

4) Composition du milieu de culture

La composition du 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 2002*).

a) Les substrats énergétiques

Comme vu dans la partie 1, l'embryon utilise certaines molécules, contenues dans le fluide tubaire, pour son métabolisme énergétique (paragraphe I.4.a).

Pour la culture embryonnaire, cet apport énergétique peut être assuré par la présence dans le milieu de certaines molécules, parmi lesquelles on retrouve :

- les acides carboxyliques (lactate et pyruvate), et certains acides aminés comme l'aspartate (*Leese 2008*), sont utilisés par les embryons jusqu'au stade clivé (troisième jour). Le pyruvate aurait également

un rôle antioxydant dans le milieu. La concentration en pyruvate recommandée, car retrouvée dans les trompes, (*Dickens et al. 1995*), se situe entre 0.2 et 0.5 mmol/L et celle des lactates entre 5 et 10 mmol/L (*Morbeck et al. 2014, 2017*). Un certain ratio lactate/pyruvate serait important à respecter dans le milieu de culture pour maintenir l'équilibre redox (*Morbeck et al. 2017*).

- le glucose est le substrat essentiel de la glycolyse pour les stades embryonnaires tardifs, morula et blastocyste (*Leese 2012*). Il a été montré qu'une absence de glucose dans les milieux de culture, provoquait un arrêt de développement au stade morula (*Pantaleon et al. 2008*). Sa présence en trop forte concentration dans les milieux pourrait être délétère pour le développement des stades plus précoces (*Quinn et al. 1995*).

b) Les acides aminés

Au vu des nombreuses fonctions des acides aminés sur l'embryon (vu précédemment), leur présence dans le milieu de culture est indispensable. Il a été rapporté qu'une brève période sans acides aminés dans le milieu pouvait compromettre le développement embryonnaire (*Gardner and Lane 1996*).

Seuls les acides aminés non essentiels sont nécessaires pour les stades embryonnaires précoces, alors que les acides aminés essentiels sont utilisés principalement par les stades tardifs notamment pour la formation de la masse cellulaire interne. Les acides aminés essentiels pourraient être délétères pour les stades précoces (*Gardner and Lane 1998*).

Au cours de la culture embryonnaire, à 37°C, les acides aminés ont tendance à se décomposer, de manière temps-dépendant, en libérant des ions ammonium (*Schneider et al. 1996*), embryotoxiques à partir d'une concentration d'environ 75 µM. En effet, à ces concentrations, certaines voies métaboliques cellulaires et l'expression de certains gènes peuvent être affectées (*Gardner et al. 2013*), impactant négativement le taux d'implantation, le développement fœtal et le poids à la naissance (*Dumoulin 2010, Kleijkers et al. 2016*). De plus, ces effets néfastes seraient amplifiés dans des conditions de culture atmosphériques (O₂ à 20 %) (*Wale and Gardner 2016*).

La L-glutamine, acide aminé bien identifié comme indispensable pour le développement embryonnaire, est très labile à 37°C et est un grand pourvoyeur de ces ions ammonium (*Kleijkers et al. 2016*).

Du fait du caractère statique de la culture embryonnaire, ces déchets métaboliques toxiques s'accumulent avec les jours de culture. Des moyens existent au laboratoire afin de limiter le plus possible cette toxicité : par exemple, pour les milieux de culture globaux, la solution est d'incorporer une forme stabilisée dipeptidique de glutamine (alanyl ou glycyl-glutamine), moins pourvoyeuse d'ammonium (*Lane and Gardner 2003*) ; pour les

milieux de culture séquentiels, le renouvellement du milieu au bout de 48 h va participer à la clairance de ces déchets.

c) Les protéines

L'albumine est la protéine la plus abondante dans le tractus féminin (*Leese 1988*) et est donc essentielle dans la composition des milieux de culture embryonnaire.

Elle est souvent utilisée dans le milieu sous forme d'HSA (human serum albumin), forme recombinée ou non recombinée. L'utilisation d'HSA sous forme recombinée est recommandée actuellement dans les milieux de culture car elle paraît plus sûre que les autres préparations (*Le Caire 2018*).

L'incorporation d'albumine sous forme de complexe protéique est également possible. Dans ce cas, elle peut s'associer à d'autres molécules comme, par exemple, du dextran ou des globulines (alpha et béta). Le dextran a un rôle tensio-actif et peut limiter l'adhésion de l'embryon sur la paroi des boîtes de culture. Son réel bénéfice dans les milieux est cependant discuté (*Consensus du Caire 2020*). Les préparations à base de globulines, bien qu'ayant possiblement un effet positif sur le taux de naissance en AMP (*Meintjes et al. 2009*), sont mal définies et peuvent contenir des taux élevés de métaux pro-oxydants (*Morbeck et al. 2014*). De plus, ces dernières souffrent de variations importantes d'un lot à l'autre.

d) Autres composants

Les antibiotiques, souvent incorporés sous la forme de gentamicine, sont utiles, bien que non indispensables, pour prévenir d'éventuelles infections bactériennes du milieu (*Swain 2015*).

L'EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) a un rôle de chélateur important de certains ions métalliques toxiques potentiellement présents dans le milieu. En chélatant et neutralisant le magnésium présent dans le milieu de culture, l'EDTA pourrait par contre avoir un impact négatif sur la glycolyse et être donc délétère à partir du stade morula (le magnésium est un cofacteur impliqué dans la glycolyse) (*Lane and Gardner 2001*). Cependant, sa très faible concentration dans les milieux de culture (inférieure à 0.01 mmol/L) éviterait cet effet indésirable sur la glycolyse (*Gruber and Klein 2011*).

Le rouge phénol peut être utilisé comme contrôle qualité visuel pour la mesure du pH du milieu. Son utilisation est cependant non systématique par les laboratoires du fait d'effets délétères rapportés, mais discutés, sur l'embryon : il pourrait être source de ROS après exposition lumineuse par exemple (*Nakayama et al. 1994*).

L'utilisation de volumes de milieu de plus en plus restreints (quelques dizaines de microlitres) le rend également moins pertinent pour un contrôle visuel de routine.

L'acide hyaluronique est une molécule de la famille des glycosaminoglycanes présente dans le tractus féminin et connue notamment pour faciliter l'adhésion cellulaire. Cette molécule possède des récepteurs à la surface des embryons, ainsi que des récepteurs sur les cellules endométriales (*Sifer et al. 2009*). Il a été montré, dans l'utérus de souris, une forte augmentation d'acide hyaluronique endométriale durant la fenêtre implantatoire, revenant à un niveau basal en dehors de cette période (*Sifer et al. 2009*). Certains fournisseurs proposent de l'incorporer dans certains milieux de culture, ou dans des milieux spécifiques au transfert embryonnaire. En effet, un impact positif sur les taux d'implantation a été rapporté avec cette molécule (*Bontekoe et al. 2010*), grâce notamment à son effet bénéfique sur le processus d'implantation.

L'insuline, de par son action anabolique, pourrait avoir un effet bénéfique sur le développement embryonnaire et le taux de grossesse (*Fawzy et al. 2017*).

De nombreuses autres molécules peuvent être incorporées dans les milieux de culture comme, par exemple, l'acide lipoïque, la choline, des vitamines, des facteurs de croissances, etc. Des études ont rapporté, entre autres, des effets antioxydant, trophique ou anabolique de ces composants sur les embryons (*Consensus du Caire 2020*).

5) Type de culture

Les milieux de culture utilisés peuvent être de deux types : globaux ou séquentiels.

Ces derniers utilisent l'approche « Back to nature » et 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.

Au contraire, les milieux globaux utilisent l'approche « Let the embryo choose » et sont continus du premier jour au dernier jour de culture, sans changement. Ils contiennent donc tous les nutriments nécessaires à l'embryon jusqu'à son développement au stade blastocyste (*Biggers and Racowsky 2002*).

Il n'a pas été montré de différence significative sur les taux d'implantation entre ces deux types de milieu (*Youssef et al. 2015*). Cependant, les milieux de culture globaux ont un avantage pratique non négligeable, en routine, dans un laboratoire de FIV : l'activité chronophage de changement de chaque milieu au troisième jour de culture est évitée.

La culture embryonnaire peut se dérouler, soit de manière individuelle, soit groupée avec plusieurs embryons, plus ou moins distants, dans le même milieu. Cette dernière aurait des effets positifs pour la stimulation de la production de facteurs de croissances autocrines et paracrines (actifs sur les embryons voisins). Cela aurait un impact positif sur les taux de compaction et blastulation, par rapport à de la culture individuelle (*Ebner 2010*).

Cependant, *Rijnders and Jansen (1999)* ont montré une diminution du taux de blastulation d'environ 6 % par embryon supplémentaire dans un même environnement. De plus, la culture groupée pourrait être délétère en cas d'embryons de mauvaise qualité coprésents dans le milieu (*Tao et al. 2013*).

Actuellement, il n'existe pas de vrai consensus dans la littérature sur la manière dont il faudrait mettre en place la culture embryonnaire in vitro (*Wale and Gardner 2016*). Les choix de volume de milieu à incuber, ou de type de culture à réaliser, sont plus des choix pratiques, où chaque laboratoire de FIV aura sa propre stratégie de culture embryonnaire, en lien avec son activité.

6) Manipulations

Au cours d'un processus de FIV, il est souvent nécessaire de sortir les ovocytes et les embryons des incubateurs pour les observer et/ou les manipuler. En plus de les soustraire d'un environnement contrôlé, leur manipulation peut être pourvoyeuse de stress de cisaillement (non retrouvé in vivo). Des études chez la souris ont montré qu'un stress de cisaillement trop intense pouvait entraîner un arrêt de développement des embryons, via une perturbation de la cascade enzymatique intracellulaires des MAP kinases (*Xie Y 2006, 2007*).

Dans tous les actes de FIV qui le nécessitent, la manipulation des ovocytes et embryons doit donc être réduite au minimum et être la plus douce possible.

II) Le pH des milieux de culture et ses variables

Le pH des milieux de culture (pHe) est un autre paramètre essentiel à maîtriser en culture embryonnaire (*figure 19*). En effet, nous avons vu précédemment (partie 1, paragraphe I.4.b) que le pH interne (pHi), des ovocytes et des embryons, est influencé par le pH extérieur. Des variations de celui-ci peuvent avoir des conséquences délétères sur leur développement et leur survie.

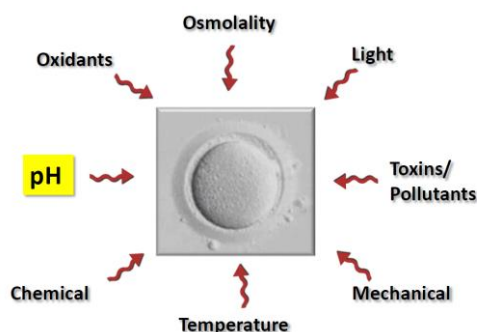


Figure 19 : le pH des milieux de culture, l'un des nombreux facteurs pourvoyeur de stress embryonnaire (Webinar: Practical pH for the IVF Lab, Jason Swain 2013)

1) Importance du pHe en FIV

Le maintien d'une valeur stable du pHe est primordial dans de nombreuses étapes de la FIV afin d'assurer la meilleure homéostasie possible du pH_i, et donc le meilleur environnement de culture embryonnaire.

Au-delà de l'impact visible sur le développement embryonnaire, il a été montré que des variations de pHe, dans un processus de FIV, peuvent avoir des conséquences négatives sur la croissance fœtale en cas de grossesse (*Zander-Fox et al. 2008*).

Au laboratoire, plusieurs actes techniques peuvent fragiliser des cellules déjà très sensibles aux variations de leur environnement.

Il a été rapporté que :

- les ovocytes, récupérés après la ponction ovarienne, sont les cellules les plus sensibles aux variations du pHe (capacité intrinsèque moindre à réguler leur pH_i, comme vu précédemment). Ils seront un peu plus robustes pour réguler leur pH_i par la suite mais seulement six à huit heures après une potentielle fécondation (*Erdogan et al. 2005, Phillips et al. 2002*).
- les cellules du cumulus oophorus péri-ovocyttaire aideraient l'ovocyte à réguler un peu son pH_i ; la pratique d'une FIV-ICSI, avec décoronisation préalable obligatoire, rendrait ces ovocytes dénudés encore plus sensibles (*Fithharris et al. 2006-2007*).
- les embryons congelés ont de moins bonnes capacités de régulation de leur pH_i par rapport à des embryons non congelés, et celles-ci seront restaurées seulement trois heures après une potentielle décongélation (*Lane et al. 1999, Swain 2011*).
- la capacitation, la réaction acrosomique et l'attachement des spermatozoïdes à la zone pellucide, au cours d'une FIV conventionnelle, sont pHe-dépendant (*Hamamah et al. 1996, Brook et al. 1996, Dale et al. 1998*). Une meilleure fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes, associée à un meilleur taux de clivage, ont été rapportés avec une valeur de pHe aux alentours de 7.5 (plus haute que celui recommandé classiquement par les fournisseurs des milieux), comparés à des valeurs de 7.0 ou 8.0 (*Dale et al. 1998*).

2) Régulation du pHe en FIV

Au cours d'un processus de FIV, les boîtes de culture embryonnaire sont placées en incubation dans des incubateurs, contrôlés en gaz et en température. Les milieux de culture utilisés sont, dans la majorité des cas, tamponnés avec des ions bicarbonates HCO₃⁻ (concentration fixée par le fournisseur et variable en fonction du milieu).

La régulation du pHe en FIV est habituellement assurée par le système tampon CO₂/HCO₃⁻ (*Swain 2010*).

L'équation d'équilibre, impliquant la formation d'acide carbonique, est la suivante :

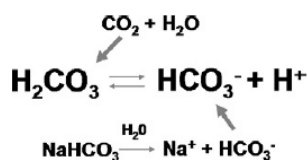


Figure 20 : formation d'ions HCO_3^- et H^+ à partir du CO_2 et du NaHCO_3 (Swain, 2010)

De manière simple, tout apport supplémentaire en CO_2 par l'incubateur (pour une concentration en HCO_3^- fixée) va déplacer cette équation vers la droite (figure 21), entraînant une augmentation de la concentration en H^+ dans le milieu, diminuant donc le pHe et acidifiant alors le milieu (relation inverse en cas de diminution de l'apport en CO_2).

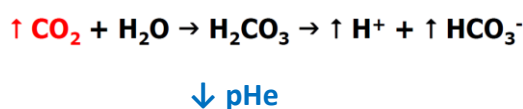


Figure 21 : variation du pHe en fonction des variations du CO_2

Le couple $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ possède un pKa (constante d'acidité d'un couple acide/base) de 6.1 à 37°C, ce qui veut dire que, à cette température, ce système essaiera de stabiliser le pHe autour de cette valeur, bien éloignée de celle compatible avec les survies ovocytaire et embryonnaire (entre 7.0 et 7.4, comme vu précédemment).

La supplémentation en bases bicarbonates dans les milieux de culture (par le fournisseur) est nécessaire pour :

- d'une part, augmenter le point d'équilibre du pHe au-dessus de 7.0. Cela permet de rendre viable le milieu de culture pour les ovocytes et embryons.
- d'autre part, placer le pHe légèrement au-dessus du pH_i qui est, pour rappel, d'environ 7.1. Ceci permet de compenser une certaine acidification obligatoire du milieu par le métabolisme de l'embryon au cours de son développement (Gatimel et al. 2019).

Au vu des différentes données de la littérature, les fournisseurs des milieux ont fixé une fenêtre de pHe, optimale pour la survie et le développement embryonnaire, entre 7.2 et 7.4 (fenêtre légèrement variable d'un milieu commercial à un autre).

Cependant, les ions HCO_3^- présents dans le milieu ont la propriété d'être instables et volatiles à 37°C et doivent être régénérés par un apport constant en CO_2 . De ce fait, le système $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ est considéré à l'équilibre lorsque la teneur en CO_2 délivrée par l'incubateur est aux alentours de 5 % à 37°C (thèse scientifique de Dupont-Monod Juliette, 2014). En culture embryonnaire, les fournisseurs des milieux recommandent généralement d'utiliser une consigne en CO_2 entre 5 et 6 %.

La concentration en HCO_3^- du milieu étant fixe, on comprend donc que le seul levier d'action au laboratoire pour réguler le pHe dans l'intervalle recommandé (7.2 – 7.4), sera par l'apport en CO_2 des incubateurs et sa dissolution dans le milieu.

3) Dynamique du pHe

Schématiquement, le pHe évoluera en trois phases au cours de la culture embryonnaire (figure 22) (Swain 2010):

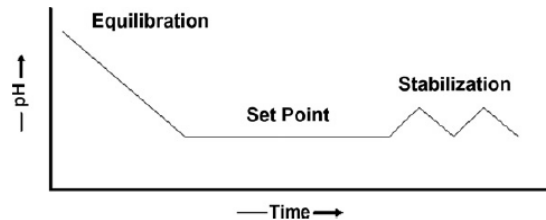


Figure 22 : les trois phases d'évolution du pHe en culture embryonnaire (Swain 2010)

- **Une phase initiale d'équilibration :**

Elle correspond à la durée nécessaire pour que le pH initial du milieu de culture atteigne sa valeur set point d'équilibre lorsque celui-ci est incubé avec un certain taux de CO_2 . Cette durée d'équilibration est assez variable et directement dépendante de la vitesse de diffusion du CO_2 dans le milieu, elle-même influencée par plusieurs facteurs comme le volume du milieu incubé, le volume d'huile de recouvrement, le type de boîte (avec couvercle ou non), etc. Conaghan et al. (2008) ont étudié la cinétique d'équilibration du pHe avec des volumes de milieux de culture de 50 ou 500 μL , incubés sous huile, sous 6 % de CO_2 et à 37°C : ils ont observé un délai minimum de huit heures (pour les plus petits volumes) à dix heures (pour les plus gros) pour permettre au pHe d'atteindre sa valeur d'équilibre dans ces conditions.

- **Une deuxième phase d'équilibre (ou set point) :**

Elle correspond à la période pendant laquelle la valeur du pHe est à l'équilibre, dans un incubateur délivrant un taux de CO_2 donné. C'est au cours de cette phase que la valeur du pHe doit être comprise dans la fourchette recommandée par les fournisseurs des milieux, entre 7.2 et 7.4 (selon le type de milieu), et que la culture embryonnaire doit être initiée.

- **Une troisième phase de stabilisation :**

Le pHe est un paramètre dynamique qui peut facilement fluctuer, dans un sens ou l'autre, et s'écarter de sa valeur d'équilibre. Différents facteurs, fréquemment retrouvés en culture embryonnaire, sont susceptibles de le perturber comme les ouvertures répétées des incubateurs, les sorties des embryons pour leur observation ou

manipulation, l'évaporation du milieu, etc. Pour contrer cela, des mesures préventives doivent être mises en place au laboratoire comme, par exemple, limiter les ouvertures des incubateurs au strict minimum, réduire le temps d'observation des embryons, utiliser de l'huile de recouvrement sur les milieux, etc.

Koustas et al. (2011) ont étudié l'impact des fluctuations du pHe sur le développement embryonnaire de souris, lors de la sortie brève (quelques minutes) des embryons hors incubateur (température maintenue fixe à 37°C) : ils ont remarqué une diminution des taux de blastulation et d'éclosion, un plus faible nombre de cellules, plus d'apoptose et des plus petits poids fœtaux par rapport à des embryons non sortis. Ces effets négatifs seraient possiblement expliqués par des perturbations épigénétiques sur les embryons.

Conaghan et al. (2008) ont étudié le comportement du pHe lorsque les milieux sont sortis quelques minutes hors incubateur : ils ont montré que cinq minutes suffisaient pour que le pHe perde sa valeur d'équilibre et dépasse la valeur de 7.4, même en présence d'huile de recouvrement. Un des avantages des systèmes d'incubation avec time-lapse, en minimisant les sorties, est de permettre de réduire les fluctuations de pHe et donc le stress embryonnaire.

Pour préserver le plus longtemps possible la valeur d'équilibre du pHe et éviter ainsi les effets néfastes de fluctuations de ce dernier sur le développement embryonnaire, l'ajout de système tampon zwitterionique dans les milieux peut être intéressant (*Swain 2010*). Un composé zwitterionique est un composé qui, dans une solution, est capable de capter ou de céder des ions H⁺ en fonction de la valeur du pH, de manière à le stabiliser autour de son pKa (chaque composé zwitterionique aura son propre pKa). En pratique, sans l'ajout d'un tel système, le pH du milieu de culture aura tendance à augmenter, de manière temps-dépendant, lorsque ce dernier est sorti d'un environnement contrôlé en CO₂ (incubateur). Par contre, en présence d'une concentration définie d'un tampon zwitterionique dans le milieu, le pHe sera maintenu autour du pKa du zwitterion malgré l'absence d'un apport continu en CO₂. Ces systèmes tampons sont particulièrement intéressants lors des étapes de recherche ovocytaire, vitrification et transfert embryonnaire, où les ovocytes et embryons sont souvent sortis plusieurs minutes dans un environnement pouvant être stressant (pas de recommandations cependant sur leur utilisation lors des ICSI, *Swain and Pool 2009*).

Les 2 principaux tampons zwitterioniques utilisés en culture embryonnaire sont :

- l'HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic) : c'est une molécule possédant un pKa de 7.48 à 25°C et qui descend à 7.31 à 37°C, ce qui en fait un excellent tampon dans des milieux de culture généralement chauffés à 37°C (*Swain 2010*). De plus, il a été rapporté des effets positifs possibles de l'HEPES sur la maturation ovocytaire (*Byrd et al. 1997*), la fécondation (*Hagen et al. 1991*) et le développement embryonnaire (*Ozawa et al. 2006*) à température ambiante mais seulement en cas de

présence simultanée de bicarbonates dans les milieux (impact négatif observé sur le développement embryonnaire en l'absence d'ions HCO₃⁻ associés) (*Mahadevan et al. 1986*).

- le MOPS (3-(N-morpholino)-propanesulphonic) : il est considéré comme la molécule zwitterionique la plus efficace pour tamponner le pHe à température ambiante (pKa de 7.2). Cependant, son utilisation seule est discutable car, dans un milieu chauffé à 37°C, son pKa descend autour de 7.0 (*Swain 2010*).

Il n'a pas été rapporté d'effets embryotoxiques pour des concentrations d'HEPES ou de MOPS jusqu'à 50 mmol/L (concentrations usuelles entre 20 et 25 mmol/L) quand ils sont utilisés dans un milieu contenant 25 mmol/L de bicarbonates, sous 5 % de CO₂ (*Swain and Pool 2009*).

Enfin, des associations de différentes molécules zwitterioniques seraient intéressantes pour essayer de cibler un pKa précis à une température donnée. Cela peut permettre d'optimiser la stabilité du pHe lors des sorties des milieux, et de limiter des toxicités éventuelles lors de l'utilisation de fortes concentrations de molécules seules (*Swain and Pool 2009*).

4) Facteurs de variabilité du pHe en FIV

Dans un laboratoire de FIV, il est important de savoir que le CO₂ délivré par les incubateurs n'est pas le seul paramètre à avoir une influence sur le pH du milieu de culture et sur le pH interne.

Plusieurs autres facteurs sont à prendre en compte, comme par exemple (*Gatimel et al. 2019*) :

- la température au sein des incubateurs : comme vu ci-dessus, elle peut avoir une influence sur la valeur de pKa d'éventuels tampons zwitterioniques présents dans le milieu, et donc sur la valeur du pHe. De plus, la température peut influencer directement la conductance des ions H⁺ dans le milieu, ce qui aura également un impact sur le pHe (*Roose 1981*).

- la composition du milieu de culture : pour un même taux de CO₂ délivré, le pHe ne sera pas identique d'un milieu à un autre en fonction de la concentration en certaines molécules indispensables au métabolisme de l'embryon. Par exemple, la présence d'autres acides dans le milieu, comme des lactates (à une concentration d'environ 5 mM), peut faire varier le pH_i des zygotes de 0.1 point (*Edwards et al. 1998*).

- la durée de la culture : *Tarahomi et al. (2018)* ont montré qu'une légère augmentation du pH_i au cours de la culture pouvait avoir lieu. Elle pourrait être expliquée par un changement de composition en acides aminés et protéines du milieu secondaire au métabolisme de l'embryon, et/ou par une possible légère évaporation du milieu au fil des jours de culture.

- l'altitude du laboratoire : avec l'altitude, la pression des gaz diminue. Pour un même milieu de culture et entre deux laboratoires situés à des altitudes différentes par rapport au niveau de la mer, une augmentation ou diminution du taux de CO₂ délivré sera probablement nécessaire pour maintenir une valeur optimale de pHe.
- le CO₂ et les ions HCO₃⁻ : ils ont la particularité d'être directement utilisables par l'embryon pour son métabolisme, faisant ainsi varier leur concentration interne et donc la valeur du pHi, indépendamment de la valeur du pHe.
- les changements de lot du milieu : il a été rapporté une variation possible d'environ 0.2 point du pHe au changement de lot d'un même milieu de culture (*Tarahomi et al. 2018*).

Partie 3 : Validation de méthode

I) Accréditation en France et métrologie

1) Accréditation

Les actes de biologie médicale reposent sur des méthodes qui nécessitent des validations. En France, la validation de ces méthodes est encadrée par la norme NF EN ISO 15189 et a pour objectif leur accréditation. Celle-ci est délivrée par une instance unique en France depuis 2008 : le Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Les objectifs généraux de l'accréditation sont de garantir la fiabilité des examens de biologie médicale réalisés et la qualité de la prestation médicale offerte par un laboratoire de biologie médicale (LBM) ; elle est obligatoire selon l'article L. 6221-1 du Code de la santé publique. Celle-ci est délivrée pour une durée de 4 ans pour le premier cycle puis renouvelable ensuite par période de 5 ans au maximum et des évaluations sur site ont lieu régulièrement pour surveiller que les conditions de cette accréditation sont bien remplies.

Pour aider à la validation d'une méthode, les référentiels utilisables sont la norme NF EN ISO 15189 et l'ensemble des documents édités par le COFRAC reconnus comme étant appropriés pour répondre aux exigences de cette norme. Pour le secteur de la biologie de la reproduction, les référentiels les plus couramment utilisés sont les guides techniques d'accréditation en biologie de la reproduction (SH GTA 05) et en biologie médicale (SH GTA 04), les documents SH REF 02 et SH REF 08, ainsi que l'arrêté du 30 juin 2017, relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation.

Le document SH REF 08 permet de valider une méthode selon la portée d'accréditation appropriée : vérification sur site des performances d'une méthode déjà reconnue (portée flexible standard de type A) ou développement d'une propre méthode en interne au laboratoire (portée flexible étendue de type B). Le COFRAC met à disposition un formulaire, ayant pour objectif d'aider les LBM à réaliser un dossier de validation/vérification d'une méthode selon les exigences normatives attendues : ce formulaire est le SH FORM 43. Selon ce formulaire, un dossier de validation/vérification d'une méthode doit comprendre les items suivants :

- présentation du processus analytique (étape(s), méthode(s), éléments à vérifier/valider)
- maîtrise des risques
- détermination des critères de performances à vérifier
- détermination des spécifications ou limites acceptables (objectifs à atteindre) de ces critères
- vérification bibliographique
- plan d'expérience et mise en œuvre expérimentale dans le laboratoire
- compilation et traitement statistique des données obtenues

- conclusion et décision quant à la validation opérationnelle de la technique, au regard des spécifications (limites acceptables) initialement fixées : déclaration d'aptitude par un biologiste responsable.

Dans un laboratoire de FIV, l'évaluation des ovocytes et des embryons sont les deux méthodes biologiques à accréditer. Les actes de FIV et la culture embryonnaire constituent le pré-analytique de cette évaluation. La validation de méthode est essentiellement basée sur une maîtrise de risques qui repose elle-même sur plusieurs points cruciaux tels que l'identitovigilance et le suivi métrologique de certains paramètres dits critiques (pH des milieux de culture, température des incubateurs, etc.). Dans le cas où le laboratoire décide de surveiller le pH de ses milieux, une méthode de mesure est mise en place, nécessitant elle aussi une validation.

2) Surveillance métrologique

Les opérations de suivi métrologique permettent la maîtrise des conditions de réalisation des processus pré-analytiques et analytiques par le laboratoire. Celles-ci doivent être adaptées aux besoins du laboratoire, déterminées à l'aide d'une analyse de risque et/ou des données issues de la vérification sur site ou de la validation de méthode. L'évaluation de la fonction métrologique est réalisée lors de l'évaluation de l'accréditation. Cette dernière évaluera la cohérence et la pertinence de la stratégie métrologique mise en œuvre par le laboratoire, afin de répondre à ses besoins.

Les exigences de surveillance métrologique sont également encadrées par la norme NF EN ISO 15189 et les autres référentiels cités précédemment. Le document SH REF 02 précise qu'il est attendu du LBM qu'il identifie si ses équipements employés sont « critiques », c'est-à-dire susceptibles d'affecter les résultats d'examen de biologie médicale. Il identifie les grandeurs mesurées correspondantes (masse, volume, température) ainsi que les exigences métrologiques spécifiées (tolérances et plages d'utilisation) et décide du type de raccordements nécessaires pour assurer la traçabilité des résultats de mesure selon un programme d'étalonnage. Le raccordement métrologique doit concerner uniquement les équipements du laboratoire ayant une influence sur le résultat (dit « critiques »).

En pratique, le laboratoire peut mettre en place une stratégie métrologique en plusieurs étapes (*figure 23*) (*SH GTA 05*) :

- **Analyse des besoins :**

Le laboratoire analyse ses besoins (équipements et grandeurs « critiques » ...) et les modalités possibles de raccordement après une analyse bénéfice/risque, prenant en compte notamment le risque potentiel de dérèglement (robustesse...) et les interventions susceptibles de modifier l'exactitude de la

mesure de l'équipement raccordé (maintenance, nettoyage...). Cette analyse permet ainsi au laboratoire de déterminer une fréquence de raccordement adaptée à l'impact éventuel.

- **Étalonnage :**

Une fois ses équipements et grandeurs critiques identifiés et nécessitant un raccordement, le laboratoire définit ses exigences métrologiques spécifiées : tolérances ou écarts maximaux tolérés (EMT), niveau d'incertitude et plages d'utilisation. Les modalités de raccordement doivent être consignées par écrit, en précisant notamment : le mode opératoire, la fréquence, le type de raccordement (interne/externe) ... constituant ainsi un programme d'étalonnage.

- **Vérification métrologique :**

Après un étalonnage, le laboratoire doit vérifier que ses exigences métrologiques spécifiées (EMT notamment) sont en adéquation avec son équipement : c'est la confirmation métrologique. Il enregistre alors la conformité (ou non) de son équipement.

- **Suivi métrologique :**

Lors de l'utilisation courante de l'équipement raccordé, le laboratoire doit suivre ses grandeurs pour s'assurer de l'absence de dérives. Il met en place des contrôles intermédiaires selon des modalités et une fréquence préalablement établie. Le suivi sera réalisé soit directement par le laboratoire soit par un fournisseur.

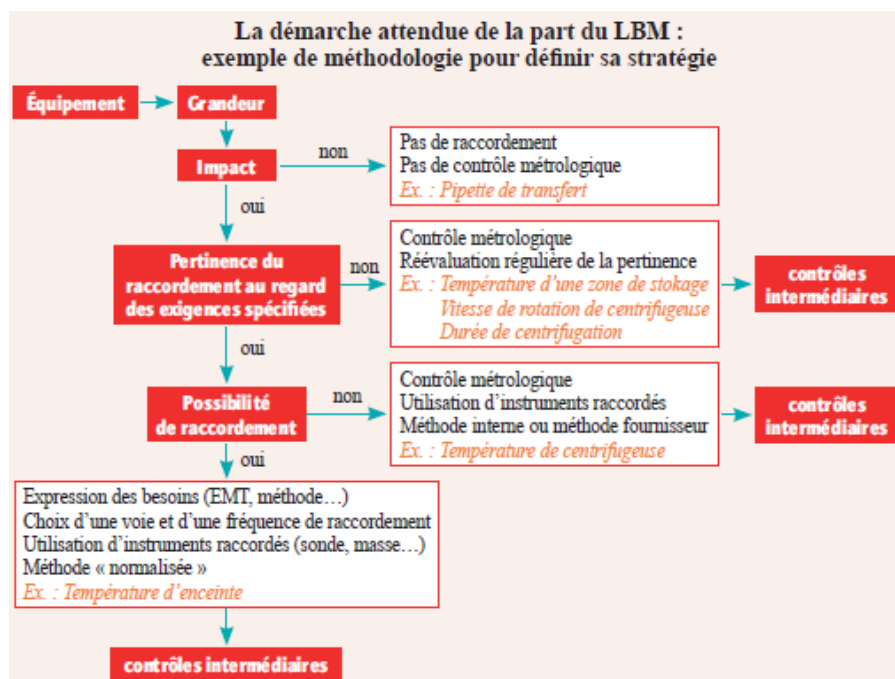


Figure 23 : Exemple de stratégie métrologique dans un LBM (SH GTA 05)

II) Maitrise des risques et métrologie en FIV

Dans un laboratoire d'AMP, les incubateurs sont considérés comme équipements « critiques » puisque ces derniers concentrent les exigences métrologiques de paramètres critiques en culture embryonnaire : la température et la concentration en CO₂ (et donc le pH des milieux). Nous avons vu précédemment (partie 2) l'importance de maîtriser ces facteurs environnementaux afin d'assurer le meilleur développement embryonnaire possible. Cette maîtrise de risques, dont fait partie la maîtrise d'un pH optimal pour les milieux de culture, est nécessaire tout au long du processus de FIV.

La norme ISO 15189 rappelle qu'il est essentiel de maintenir un pH du milieu de culture approprié dans un incubateur à CO₂. De même, le paragraphe I.4.1 de l'arrêté du 30 juin 2017, relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation, précise que « la composition de l'atmosphère à l'intérieur des incubateurs, par un contrôle de la teneur en gaz ou du pH des milieux incubés, est maîtrisée. Une procédure de surveillance du pH et/ou du/des gaz utilisé(s) est mise en place définissant les paramètres de criticité et de surveillance. ».

Selon le manuel SH GTA 05, la maîtrise de ce paramètre critique peut s'effectuer de deux manières :

- **soit à l'aide de sondes à CO₂** : ici, « une attention particulière devra être portée à l'incertitude de mesure et à la dérive des sondes utilisées ». C'est la méthode la plus simple et la plus utilisée dans les laboratoires d'AMP. Elle a l'avantage de permettre un suivi en continu du pHe mais reste une méthode indirecte. En effet, elle ne permet pas de connaître réellement la valeur du pHe et ce malgré des recommandations sur le taux de CO₂ définies par le fournisseur du milieu. De plus, nous avons vu précédemment (partie 2, paragraphe II), que d'autres facteurs peuvent influencer sur le pHe, parfois de manière indépendante aux caractéristiques du milieu (altitude du laboratoire, présence d'huile, etc.). Enfin, les sondes à CO₂ peuvent présenter une dérive au cours du temps et manquer de robustesse en milieu humide (incubateurs) (*Chansel-Debordeaux et al. 2018*).

- **soit grâce à des mesures directes du pHe** : dans ce cas, « le raccordement métrologique au standard interne du pH-mètre est démontré, notamment à l'aide de matériaux de référence certifiés, avec certificats comportant le logotype d'un accréditeuse signataire de l'accord de reconnaissance mutuelle. »

L'avantage de ce procédé est que l'on connaît directement la valeur du pHe à un instant « t ». Par contre, c'est une activité qui peut être chronophage, onéreuse et qui impose au laboratoire la réalisation d'une validation de méthode en amont. Ces mesures peuvent s'effectuer à l'aide d'une électrode reliée à un pH-mètre, ou par un analyseur à gaz du sang.

En pratique, la stratégie métrologique vue précédemment (paragraphe I.2) peut être appliquée pour le suivi du pH des milieux de culture : tout d'abord, le laboratoire identifie les grandeurs CO₂ et/ou pHe comme grandeurs critiques, nécessitant un raccordement (sondes à CO₂ et/ou pH-mètre/appareil à gaz du sang). Il définit secondairement ses exigences métrologiques spécifiées : pour la grandeur CO₂, une valeur cible de 5 ou 6 % avec des EMT de +/- 1 % seront généralement établis ; concernant le pH, sa valeur cible et ses EMT seront établis en fonction de l'intervalle recommandé par le fournisseur du milieu (entre 7.2 et 7.4 en général). Le suivi indirect du pH du milieu par la mesure du taux de CO₂ sera continu, alors que la fréquence des mesures directes du pH sera souvent laboratoire-dépendant (une mesure par mois et/ou à chaque changement de lot de milieu par exemple). C'est au laboratoire d'établir ses propres fréquences de contrôle du pH et les mesures correctives si nécessaire.

III) Validation de la mesure du pH des milieux de culture

Le suivi métrologique du pH peut être réalisé grâce des mesures directes de celui-ci dans le milieu (comme vu ci-dessus). Dans ce cas, comme pour toute méthode d'analyse de biologie médicale, une validation de cette mesure doit être faite, selon les exigences définies par le COFRAC. Celle-ci s'appuiera sur les référentiels cités précédemment (paragraphe I) et comprendra notamment :

- une analyse des risques encourus à chaque étape du processus et les moyens mis en œuvre pour leur maîtrise
- une évaluation des critères de performance de la méthode

Les critères de performances pouvant être évalués dans cette méthode sont les suivants (SH GTA 04) :

- **la répétabilité** : son évaluation consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même analyseur, même lot de réactifs et même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif de cette évaluation est de définir la meilleure performance possible dans des conditions optimales afin de vérifier le bon fonctionnement du système analytique pour l'analyte concerné. Il est recommandé d'utiliser au minimum deux niveaux de concentrations, choisis en fonction des valeurs physiopathologiques et dont au moins un des niveaux proche de la (des) zone(s) décisionnelle(s). De plus, le nombre de répétitions recommandées est de 30 pour une interprétation statistique optimale. Il est toutefois possible d'appliquer un nombre d'essais inférieur s'il est argumenté en fonction de critères pertinents tels que la rareté de la matrice, le coût des analyses, la durée d'analyse... tout en sachant que la valeur statistique des résultats obtenus sera d'autant plus réduite que ces effectifs sont faibles.

- **la fidélité intermédiaire** : l'évaluation de la fidélité intermédiaire consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs suivants : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages.

- **la comparaison de méthode** : ce test consiste à analyser un même échantillon avec la méthode dite de référence et la méthode à valider, dans un délai le plus court possible pour évaluer la comparabilité des résultats. La comparaison doit couvrir de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré. A partir des résultats obtenus, une droite de régression peut être établie : l'interprétation de cette droite se fait lors de l'analyse de son équation dont la pente et l'ordonnée à l'origine exprimeront la similitude des méthodes comparées : similitude optimale avec pente égale à 1 et ordonnée à l'origine égale à 0.

- **la contamination inter-échantillon** : une étude de la contamination inter-échantillons peut être effectuée de la façon suivante : après rinçage de l'appareil, un échantillon à valeur élevée est analysé trois fois consécutivement (H1, H2, H3, de moyenne mH), suivi d'un échantillon à valeur basse également analysé trois fois (B1, B2, B3). Les séquences (H1, H2, H3, B1, B2, B3) peuvent être répétées plusieurs fois (cinq fois) afin d'établir la moyenne des B1 (mB1) et la moyenne des B3 (mB3). Le pourcentage de contamination inter-échantillons est calculé selon la formule suivante :

$$\text{contamination (\%)} = (mB1 - mB3) \times 100 / (mH - mB3)$$

Le niveau de contamination doit être proche de 0 ou entraîner des règles de « repassage » argumentées.

Partie 4 : Article original : Validation d'un plan de suivi métrologique du pH en culture embryonnaire.

Résumé

Au sein d'un laboratoire d'aide médicale à la procréation, la qualité du développement embryonnaire est étroitement liée aux conditions environnementales auxquelles les embryons sont exposés, notamment dans les incubateurs. Le pH des milieux de culture est un des paramètres critiques essentiel à maîtriser en culture embryonnaire. L'objectif principal de ce travail est la validation de méthode de la mesure du pH de notre milieu de culture embryonnaire par un analyseur à gaz du sang. Les objectifs secondaires sont l'évaluation de différentes conditions pouvant faire varier la valeur de ce pH au laboratoire : manipulations du milieu, temps d'incubation du milieu, présence d'huile de recouvrement, teneur en CO₂ des incubateurs.

Nous avons choisi d'utiliser un analyseur à gaz du sang de biologie délocalisée (RapidPoint 500) pour effectuer les mesures de pH. Le milieu de culture évalué est le Continuous Single Culture Complete (CSCM-C[®]) de chez IrvineScientific et les incubateurs testés sont les incubateurs K-Systems G210[™]. Afin de valider cette nouvelle méthode de mesure du pH, des tests de stress du pH suivis d'une évaluation des performances de la méthode ont été réalisés, conformément aux exigences du COFRAC.

Les tests de performance réalisés dans ce travail montrent de bons résultats et permettent ainsi la validation de la méthode. L'étude de corrélation entre le pH du milieu de culture et le taux de CO₂ des incubateurs a permis de définir une nouvelle valeur cible de CO₂ pour les incubateurs du laboratoire : le nouveau taux optimal est de 7 % avec des EMT correspondants de +/- 1 %.

Cette nouvelle méthode de mesure du pH de notre milieu s'intégrera parfaitement dans la stratégie métrologique actuellement en place au laboratoire. Des contrôles réguliers du pH, établis selon une fréquence définie par le biologiste responsable, permettront d'adapter au mieux la teneur en CO₂ des incubateurs et participeront ainsi à l'optimisation des conditions de culture embryonnaire.

Mots clés : Culture embryonnaire, pH, CO₂, FIV, accréditation, métrologie

Abstract

In a laboratory of medically assisted reproduction, the quality of embryonic development is closely linked to the environmental conditions to which embryos are exposed, notably in incubators. The pH of culture media is one of the essential critical parameters to be mastered in embryonic culture. The main goal of this study is the validation of the pH measurement method of our embryonic culture media. The secondary objectives are the evaluation of different conditions that can fluctuate the pH in the laboratory (handling of the media, incubation time of the media, presence of covering oil, CO₂ content of the incubators).

We chose to use a blood gas analyzer (RapidPoint 500) to perform the pH measurements. The culture media evaluated was continuous single culture complete (CSCM-C®) from IrvineScientific and the incubators tested were the K-Systems G210TM incubators. In order to validate this new method of pH measurement, pH stress tests followed by an evaluation of the performance of the method were carried out, in accordance with the requirements of COFRAC (French Committee for Accreditation).

The performance tests carried out in this study showed good results and thus allow the validation of the method. The correlation study between the pH of the culture media and CO₂ rate of the incubators allowed the definition of a new CO₂ target value for the incubators in the laboratory: the new optimal rate is 7% with corresponding EMTs of +/- 1%.

This new method of pH measurement of our environment will fit perfectly with our metrological strategy currently in place in the laboratory. Regular pH controls, established according to a frequency defined by the head biologist, will make it possible adapt the CO₂ content of incubators and then will take part in the optimization of embryonic culture conditions.

Key words : embryonic culture, pH, CO₂, IVF, accreditation, metrology

Introduction

La culture embryonnaire est un des processus critiques de la fécondation in vitro (FIV). En effet, le succès d'une tentative de FIV va dépendre, entre autres, des conditions environnementales auxquelles l'embryon est exposé. Celles-ci doivent se rapprocher le plus possible des conditions retrouvées in vivo, dans le tractus génital féminin, afin d'assurer un développement embryonnaire optimal (*Consensus du Caire 2020*). Cependant, dans un laboratoire d'aide médicale à la procréation (AMP), de nombreux facteurs de stress sont susceptibles d'altérer le développement des embryons, et donc d'impacter négativement le taux de réussite du laboratoire (*Wale and Gardner 2016*). Parmi ceux-ci, le pH des milieux de culture est un paramètre essentiel à maîtriser car capable d'influencer directement le pH intracellulaire, et donc le développement et la survie des embryons (*Lane and Gardner 2000*).

La maîtrise de ce paramètre critique en culture embryonnaire, pour le secteur de la biologie médicale, est encadrée par la norme NF EN ISO 15189 : « le maintien d'un pH approprié du milieu de culture utilisé est essentiel dans un incubateur à CO₂ ». De même, l'arrêté du 30 juin 2017 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation précise que « la composition de l'atmosphère à l'intérieur des incubateurs, par contrôle de la teneur en gaz ou du pH des milieux incubés, est maîtrisée. Une procédure de surveillance du pH et/ou du/des gaz utilisé(s) est mise en place définissant les paramètres de criticité et de surveillance. ». Les fournisseurs des milieux de culture recommandent de maintenir un pH autour de 7.2 - 7.4 (variable selon le milieu), grâce à une atmosphère gazeuse enrichie en CO₂ pendant toute la durée de la culture.

Nous avons souhaité intégrer des mesures du pH de notre milieu de culture à notre stratégie métrologique actuelle, basée sur la mesure de la concentration en CO₂ dans les incubateurs, témoin indirect du pH du milieu. Or, ce dernier est le paramètre critique à maîtriser et il est donc important d'en avoir une mesure directe. Sa mesure à intervalle régulier sera tout à fait complémentaire du suivi du CO₂, dont les outils de mesure permettent plus aisément un suivi en continu (toutes les 15 minutes) par rapport aux mesures du pH.

L'objectif principal de ce travail est la validation de méthode de la mesure du pH de notre milieu de culture embryonnaire par un analyseur à gaz du sang. Pour répondre à cet objectif, nous avons d'abord cherché à définir les meilleurs délais et conditions de transport possibles du milieu avant la mesure du pH. Puis, nous avons évalué les critères de performance de la méthode, conformément aux exigences du COFRAC.

Les objectifs secondaires sont l'évaluation de différentes conditions pouvant faire varier la valeur de ce pH au laboratoire : manipulations du milieu, temps d'incubation du milieu, présence d'huile de recouvrement, teneur en CO₂ des incubateurs.

Matériels et méthodes

I) Présentation du matériel

1) Système actuel de suivi du CO₂ dans les incubateurs du laboratoire d'AMP

Les incubateurs utilisés dans notre laboratoire, au nombre de trois, sont les incubateurs K-Systems G210TM. Ce sont des incubateurs tri-gaz (O₂, CO₂ et N₂) et multichambres, permettant une culture dans dix compartiments indépendants. Ils sont suivis sur le plan métrologique par l'organisme fournisseur CooperSurgical[®], qui est chargé de les étalonner annuellement en CO₂, O₂ et température. Les trois incubateurs sont équipés de sondes à CO₂ reliées à un logiciel dédié à la métrologie (Sirius[®]), afin de permettre un suivi en continu de la teneur de ce gaz.

Dans nos conditions habituelles de culture embryonnaire, les consignes de l'incubateur sont : une température de 37°C, une consigne en O₂ à 5 % (de J0 à J3) ou 3 % (de J3 à J6), et une consigne en CO₂ à 6 %.

2) Système de mesure du pH évalué

Les mesures de pH ont été réalisées grâce à un analyseur à gaz du sang : le RapidPoint 500 (RP 500) de Siemens. Cet appareil de biologie délocalisée est situé au niveau de la maternité, à proximité du laboratoire d'AMP.

Le milieu de culture embryonnaire évalué dans ce travail est le milieu de culture global Continuous Single Culture Complete (CSCM-C[®]) de chez IrvineScientific. La valeur cible de pH recommandée par le fournisseur du milieu doit être comprise dans l'intervalle 7.25 et 7.40 (avec une cible idéale entre 7.26 et 7.35).

II) Validation de méthode pour la mesure du pH

1) Pré-analytique : tests de stress du pH (transport)

Quatre conditions de transport du milieu de culture ont été évaluées dans ce travail (*figure 24*). Pour chacune, un même milieu de culture est incubé la veille de l'analyse, sous huile de recouvrement, avec une consigne en CO₂ à 6 %. Trois mesures du pH ont été réalisées pour chaque condition.

Sortie du milieu de l'incubateur

(> 12 h d'incubation sous huile de recouvrement, à + 37°C, sous 6 % CO₂)

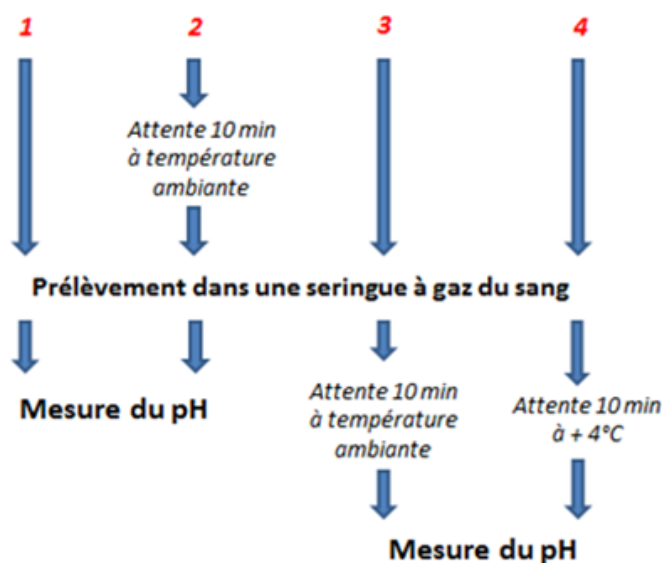


Figure 24 : Plan expérimental d'évaluation de différentes conditions de transport avant analyse du pH

2) Tests de performance de la méthode

Dans le cadre de la validation de la mesure du pH selon les exigences du COFRAC, les tests de performances retenus pour une évaluation sont les suivants :

a) La répétabilité

Dans ce travail, nous avons choisi d'évaluer la répétabilité sur 12 mesures successives du pH, le même jour, par le même opérateur. Le milieu de culture est incubé la veille, sous huile de recouvrement, avec une consigne en CO₂ à 6 %.

b) La fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire a été déterminée en faisant varier le facteur « temps », avec le même opérateur et le même milieu de culture : nous avons fait quatre mesures du pH par jour sur trois jours consécutifs (12 mesures au total).

Le milieu de culture est incubé la veille, sous huile de recouvrement, avec une consigne en CO₂ à 6 %.

c) La comparaison de méthode

Pour ce test, nous avons comparé, les résultats de pH rendus par le RP 500 (appareil à valider) avec les résultats rendus par un pH-mètre standard (sonde à électrode en verre, CYBERSCAN de EUTECH), considéré comme méthode de référence. Ce pH-mètre est raccordé à l'étalon international certifié COFRAC.

Quatre mesures de pH correspondants à quatre consignes en CO2 différentes ont été comparées :

- 5 % CO2
- 6 % CO2
- 7 % CO2
- 9 % CO2

Pour chacune des deux méthodes de mesure, le milieu de culture est incubé la veille, sous huile de recouvrement. Pour chaque consigne en CO2, trois mesures du pH ont été réalisées avec le RP 500, tandis qu'une seule mesure a été faite avec le pH-mètre.

d) La contamination inter-échantillon

La contamination inter-échantillon a été déterminée par l'analyse à trois reprises consécutives d'un échantillon à valeur de pH élevé (H1, H2, H3, de moyenne mH), suivie d'un échantillon à valeur de pH bas également analysé trois fois (B1, B2 et B3) ; chaque analyse a été faite en triplicata afin d'établir la moyenne des B1 (mB1) et la moyenne des B3 (mB3).

Deux évaluations de la contamination inter-échantillons ont été faites. Les valeurs de pH élevées correspondaient à des consignes en CO2 de 4 % et 6 %, pour des valeurs de pH basses correspondantes à des consignes en CO2 de 6 % et 8 % respectivement.

Le pourcentage de contamination entre les échantillons est calculé selon la formule suivante :

$$\text{contamination (\%)} = (mB1 - mB3) \times 100 / (mH - mB3)$$

Les mêmes milieux de culture ont été incubés la veille, sous huile de recouvrement, avec la consigne en CO2 correspondante.

III) Stabilité du pH en FIV

1) Equilibration du pH

Pour cette évaluation, une analyse du pH à T0 est réalisée au préalable, correspondant à la valeur initiale du pH du milieu de culture avant toute incubation. Puis, le même milieu de culture est incubé, sous huile de recouvrement, avec une consigne en CO₂ à 6 %. Des mesures du pH (en triplicata) sont ensuite réalisées après un certain temps d'incubation :

- T + 30 minutes
- T + 2 h
- T + 6 h
- T + 10 h

2) Etude de corrélation pH/CO₂

Nous avons réalisé une étude de comportement du pH du milieu en fonction de la consigne en CO₂ appliquée sur l'incubateur. Dans ce travail, neuf consignes en CO₂ ont été étudiées : consigne allant de 5 % à 9 % en la faisant varier de 0.5 en 0.5 % chaque jour. Le milieu de culture est incubé la veille de l'analyse, sous huile de recouvrement, avec la consigne en CO₂ évaluée. La mesure du pH est faite le lendemain, en triplicata pour chaque condition.

3) Stabilité du pH

Selon les données du fournisseur, la conservation du milieu de culture est de huit semaines maximum à + 4°C après ouverture. Nous avons évalué la stabilité du pH du milieu à + 37°C en fonction de sa date d'ouverture.

Cette étude de stabilité a été réalisée sous trois conditions (mesures en triplicata du pH pour chaque) (figure 25) :

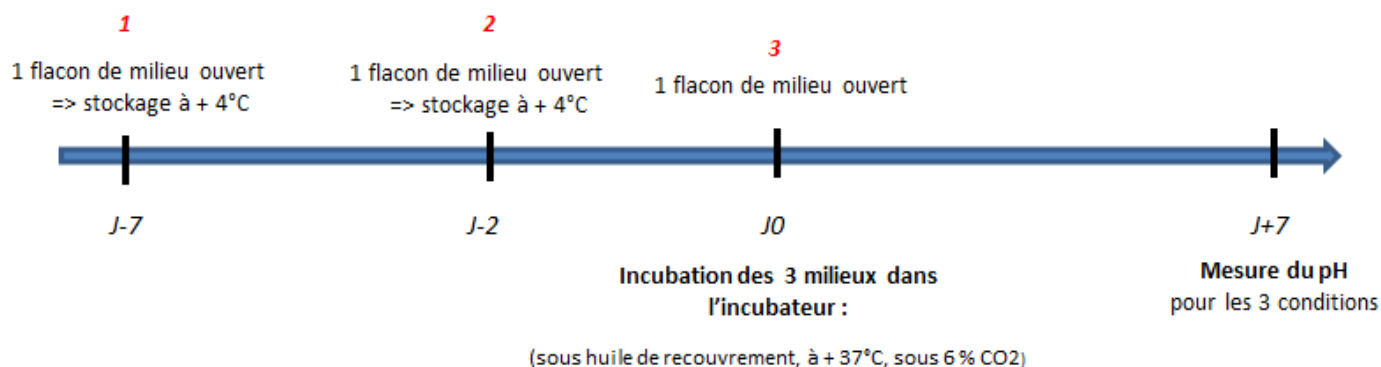


Figure 25 : Plan expérimental d'évaluation de la stabilité du pH

4) Tests de maintien du pH hors incubateur

Nous avons évalué ici les variations de pH sous deux conditions différentes de sortie du milieu hors incubateur (figure 26). Pour chacune, le pH a été mesuré à 4 temps différents : T0, T + 10 min, T + 20 min et T + 30 min, valeurs correspondantes au délai entre la sortie de la boîte de l'incubateur et l'analyse du pH (mesure du pH en triplicata à chaque temps). Tous les milieux sont incubés au préalable la veille des tests, sous huile de recouvrement, à + 37°C, sous 6 % de CO₂ :

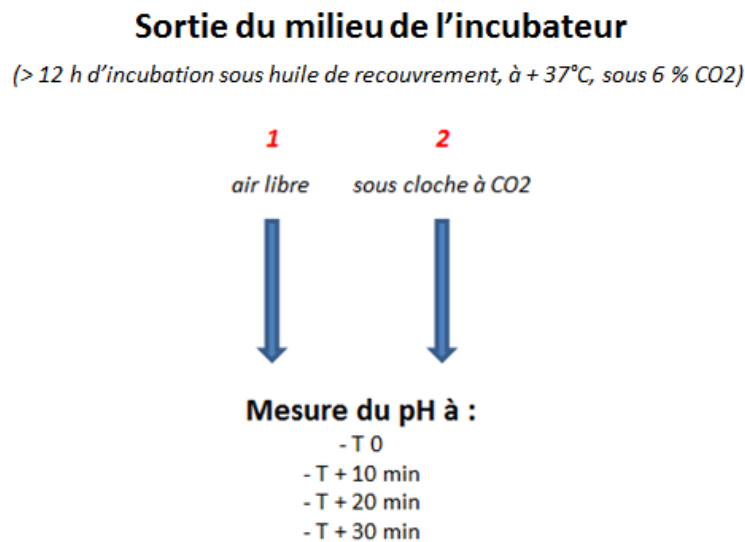


Figure 26 : Plan expérimental d'évaluation de la stabilisation du pH hors incubateur

5) Impact de l'huile de recouvrement sur le pH

Nous avons évalué l'impact de l'absence d'huile de recouvrement sur le pH une fois le milieu sorti de l'incubateur et placé sous cloche à CO₂.

Le milieu est incubé sans huile de recouvrement, la veille des tests, à + 37°C et sous 6 % de CO₂. Le pH a été mesuré à quatre temps (en triplicata à chaque temps) : T0, T + 10 min, T + 20 min et T + 30 min, valeurs correspondantes au délai entre la sortie de la boîte de l'incubateur et l'analyse du pH. Les résultats de pH de cette évaluation ont été comparés avec ceux du même test réalisé sous huile de recouvrement (décrit précédemment).

6) Comparaison entre incubateurs

Pour cette évaluation, un même milieu de culture est incubé la veille des tests, sous huile de recouvrement, à + 37°C, dans chacun des trois incubateurs du laboratoire. La consigne en CO₂ est la même pour nos trois incubateurs (6 %). Cependant, la consigne en O₂ est différente : 5 % pour deux de nos incubateurs, et 3 % pour le dernier. Les mesures du pH sont faites en triplicata pour chaque incubateur.

IV) Tests statistiques

Concernant la répétabilité et la fidélité intermédiaire, l'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (m), l'écart-type (s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série.

$$CV (\%) = \frac{(s)}{(m)} \times 100$$

Le CV calculé, exprimé en %, est comparé au CV limite acceptable préalablement choisi (fournisseurs, sociétés savantes...) : nous avons choisi pour cela d'utiliser les référentiels d'acceptation de la SFBC.

Pour les tests de comparaison entre les différentes conditions de transport de l'échantillon et entre les différents incubateurs du laboratoire, toutes les moyennes de pH mesurées (m) ont été comparées à l'incertitude de mesure connue du pH sur l'automate RP 500 : 0.3 %. Cette incertitude de mesure est issue de la validation de méthode de la mesure du pH sanguin sur le RP 500, réalisée au laboratoire de biochimie.

Deux valeurs étaient considérées significativement différentes si elles n'étaient pas comprises dans l'intervalle $[m - U ; m + U]$, avec « U » correspondant à l'incertitude de mesure calculée sur la moyenne : $U = 0.3/100 \times m$

Pour le test de comparaison de méthode entre le RP 500 et le pH-mètre de référence, un test de concordance a été réalisé : il s'agit du test de Bland-Altman. Ce dernier compare la moyenne entre les deux méthodes pour chaque valeur de pH à la différence entre les mesures obtenues par les deux méthodes. Ce test permet d'obtenir les limites d'agrément à partir de la moyenne des différences. On calcule pour cela la moyenne des différences (m), l'écart-type des différences (DS) et les limites supérieure et inférieure ($m \pm 2DS$).

A partir de ce graphique, il est alors possible d'observer si la moyenne des différences est différente ou non de zéro, et si la différence entre les mesures obtenues par les deux méthodes varie selon la valeur de pH (différence importante dans les valeurs extrêmes par exemple). L'interprétation des limites d'agrément se fait en lien avec le contexte de réalisation du test et relève seulement de la décision de l'utilisateur de considérer la concordance satisfaisante ou non. Les deux méthodes peuvent être considérées comme comparables si la plupart des points obtenus se situent dans l'intervalle donné par les limites d'agrément ($m \pm 2DS$).

Concernant les tests de stabilité et de maintien du pH, ainsi que le test réalisé sans huile de recouvrement, les valeurs de pH sortant de l'intervalle recommandé par le fournisseur du milieu (7.25 – 7.40) sont considérées comme non conformes.

Enfin, pour le test de comportement du pH en fonction du CO₂, une courbe de corrélation a été tracée à partir des valeurs de pH obtenues après application d'une certaine consigne en CO₂. Les valeurs de pH conformes étaient celles comprises dans l'intervalle recommandé par le fournisseur du milieu (7.25 – 7.40).

Résultats

I) Validation de méthode pour la mesure du pH

1) Pré-analytique : tests de stress du pH (transport)

Situations	Valeurs du pH (moyennes)
1. Prélèvement => Mesure	7.400
2. 10 min à température ambiante => Prélèvement => Mesure	7.397
3. Prélèvement => 10 min à température ambiante => Mesure	7.402
4. Prélèvement => 10 min à + 4°C => Mesure	7.408

Tableau 1 : Résultats de l'évaluation des différentes conditions de transport du milieu

Les moyennes des mesures de pH sont respectivement de 7.400, 7.397, 7.402 et 7.408 pour les conditions 1, 2, 3 et 4 évaluées (tableau 1). Pour chaque moyenne obtenue, les incertitudes de mesure calculées sont de 0.022 point de pH : toutes les valeurs mesurées sont comprises dans l'intervalle $[m - 0.022 ; m + 0.022]$. Les différences observées entre les quatre conditions de transport sont inférieures à l'incertitude de mesure et sont donc considérées comme non significatives.

2) Tests de performance de la méthode

a) La répétabilité

Nombre de valeurs	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV limite (%) (SFBC)	Conclusion
12	7.393	0.008	0.1	1.5	Conforme

Tableau 2 : Résultats du test de répétabilité

Le coefficient de variation obtenue est de 0.1 % et est inférieur au CV limite acceptable défini par la SFBC (1.5 %). Le test de répétabilité est donc conforme.

b) La fidélité intermédiaire

Nombre de valeurs	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV limite (%) (SFBC)	Conclusion
12	7.401	0.016	0.21	2	Conforme

Tableau 3 : Résultats du test de fidélité intermédiaire

Le coefficient de variation obtenu est de 0.21 %. Celui-ci est conforme car inférieur au CV limite acceptable défini par la SFBC (2 %).

c) La comparaison de méthode

Consigne en CO2 (%)	Valeurs du pH	
	RP 500	pH-mètre
5	7.458	7.43
6	7.387	7.39
7	7.313	7.33
9	7.221	7.23

Tableau 4 : Valeurs comparées du pH entre le RP 500 et le pH-mètre pour quatre consignes différentes en CO2

A partir des valeurs de pH obtenues avec le RP 500 et le pH-mètre, pour chacune des quatre consignes en CO2 évaluées (tableau 4), il est possible de tracer un diagramme de Bland-Altman afin de juger de la concordance de ces deux méthodes (figure 27 ci-dessous). On calcule pour cela la moyenne des différences ($m = -0.0003$) et les limites d'agrément autour de cette moyenne (± 0.039).

Les quatre valeurs comparées sont toutes comprises dans l'intervalle encadré par les limites d'agrément. La concordance entre ces deux méthodes peut donc être jugée satisfaisante.

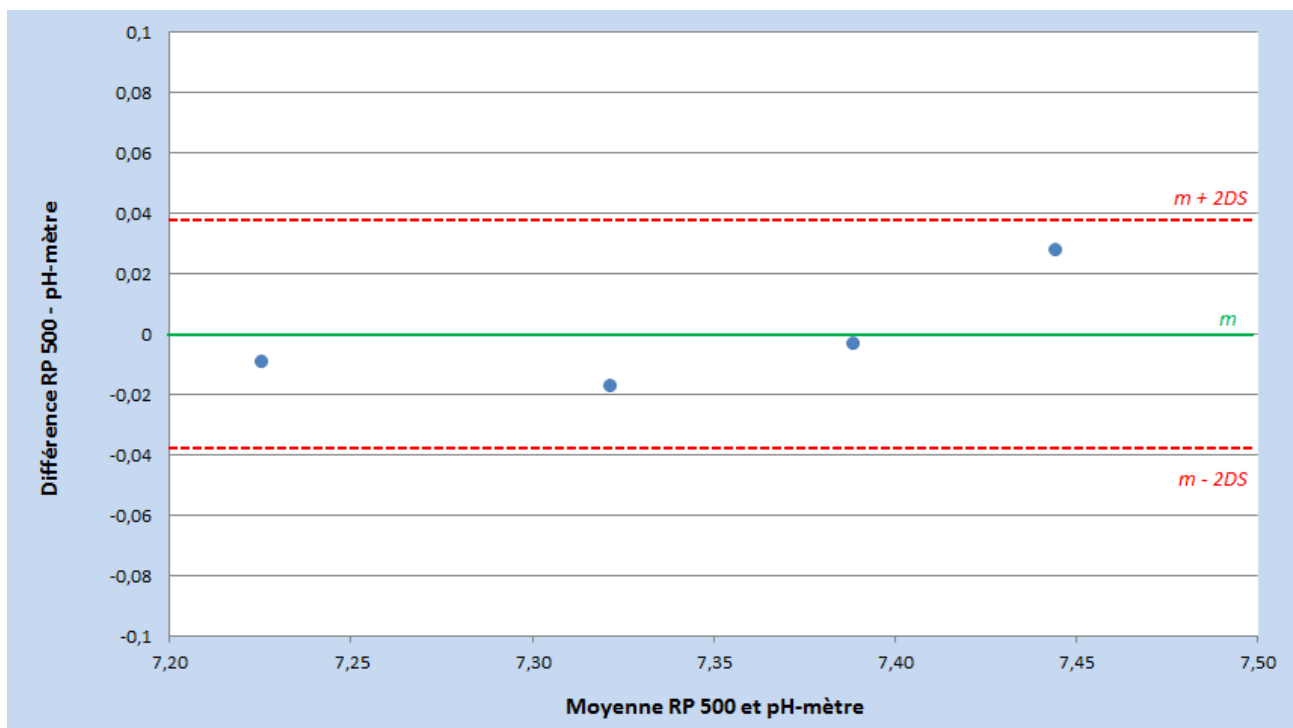


Figure 27 : Test de concordance de Bland-Altman entre le RP 500 et le pH-mètre pour la mesure du pH

d) La contamination inter-échantillon

Passages	1. Valeurs du pH (moyennes)	
	Niveau haut (6 % CO ₂)	Niveau bas (8 % CO ₂)
1	7.371	7.265
2	7.387	7.272
3	7.375	7.269
Contamination (%)	- 3.67	
Passages	2. Valeurs du pH (moyennes)	
	Niveau haut (4 % CO ₂)	Niveau bas (6 % CO ₂)
1	7.522	7.371
2	7.521	7.374
3	7.520	7.373
Contamination (%)	- 1.35	

Tableau 5 : Résultats de la recherche de contamination inter-échantillons (deux évaluations)

Pour chacune des deux évaluations de la contamination inter-échantillons, il n'est pas observé de différence significative entre les différentes valeurs basses (B1, B2 et B3) (*tableau 5*). De plus, il n'est pas observé de tendance à la diminution de ces valeurs basses au fur et à mesure du test et les pourcentages de contamination retrouvés sont représentés par des valeurs négatives (- 3.67 et -1.35).

Aucune contamination n'a donc été mise en évidence lors de ces deux évaluations.

II) Stabilité du pH en FIV

1) Equilibration du pH

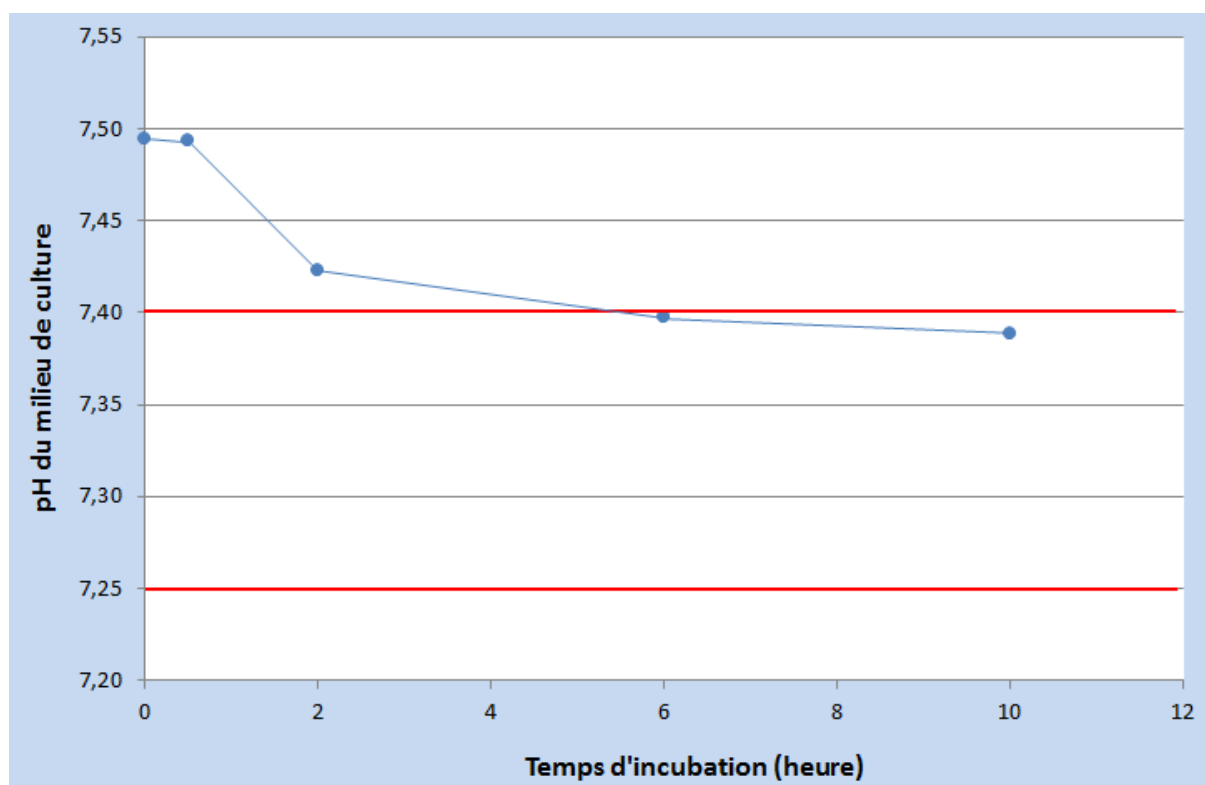


Figure 28 : Evaluation du temps d'équilibration du pH

Les moyennes des mesures de pH évoluent de 7.495 à T 0, 7.494 à T + 30 min, 7.423 à T + 2 h, 7.397 à T + 6 h et 7.389 à T + 10 h (*figure 28*). Le pH semble atteindre sa valeur d'équilibre à partir de 6 h d'incubation, à 37 °C avec une consigne de 6 % de CO₂.

2) Etude de corrélation pH/CO2

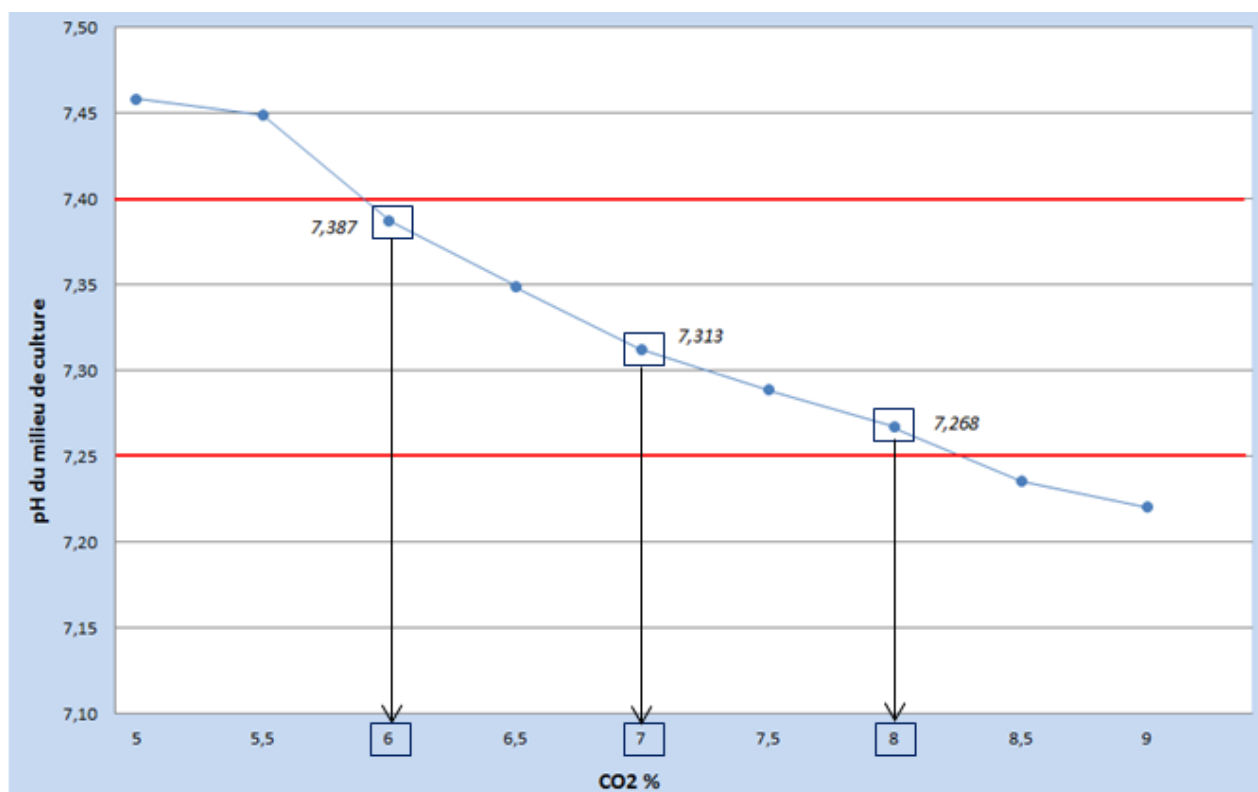


Figure 29 : Corrélation pH/CO2 avec le milieu de culture CSCM-C® pour l'incubateur K-Systems G210™

Pour notre incubateur, le taux de CO2 doit se situer entre 6 et 8 % afin d'obtenir un pH optimal, recommandé par le fournisseur du milieu, entre 7.25 et 7.40 (figure 29). A partir de cette corrélation, il est possible de définir une valeur cible en CO2 située à 7 % (correspondant à une valeur de pH de 7.313), avec un écart toléré de +/- 1 % de cette valeur cible (EMT 1 %).

3) Stabilité du pH

Situations	Valeurs du pH (moyennes)
1. Ouverture milieu 7 j à + 4°C => Incubation 7 j => Mesure	7.389
2. Ouverture milieu 2 j à + 4°C => Incubation 7 j => Mesure	7.388
3. Ouverture milieu => Incubation 7 j => Mesure	7.387

Tableau 6 : Résultats de l'évaluation de la stabilité du pH du milieu de culture

Pour les situations 1, 2 et 3, les moyennes de pH obtenues à J+7 d'incubation du milieu sont de 7.389, 7.388 et 7.387 respectivement (tableau 6). Elles sont toutes comprises dans l'intervalle recommandé par le fournisseur du

milieu (7.25 - 7.40). Le pH du milieu de culture reste donc stable à + 37°C même après une ouverture préalable du milieu (sous réserve du respect des conditions de conservation).

4) Tests de maintien du pH hors incubateur

Temps	Valeurs du pH (moyennes)	
	1. Air libre	2. Sous cloche à CO2
T 0	7.379	7.379
T + 10 min	7.369	7.376
T + 20 min	7.377	7.379
T + 30 min	7.396	7.392

Tableau 7 : Résultats de l'évaluation de la perte d'équilibre du pH du milieu de culture

Pour les deux situations et pendant toute la période évaluée, toutes les moyennes de pH obtenues sont comprises dans l'intervalle recommandé par le fournisseur (7.25 - 7.40) (tableau 7). Le pH reste donc conforme jusqu'à 30 minutes après la sortie du milieu de l'incubateur, à l'air libre et sous cloche à CO2 (incubation du milieu sous huile de recouvrement).

5) Impact de l'huile de recouvrement sur le pH

Temps	Valeurs du pH (moyennes)	
	Sans huile	Avec huile
T 0	7.453	7.379
T + 10 min	7.549	7.376
T + 20 min	7.597	7.379
T + 30 min	7.601	7.392

Tableau 8 : Résultats de l'impact de l'huile de recouvrement sur le pH du milieu.

En l'absence d'huile de recouvrement, les valeurs de pH à T0 se situent au-dessus de la limite supérieure recommandée par le fournisseur (7.40) (*tableau 8*). Sans huile, le pH est donc non conforme dès la sortie du milieu hors incubateur. De plus, dans cette situation, les valeurs de pH évoluent et ont tendance à augmenter avec le temps (de 7.453 à T0, à 7.601 à T + 30 min).

6) Comparaison entre incubateurs

Incubateurs	Valeurs du pH (moyennes)
G1 (6 % CO2 et 3 % O2)	7.365
G2 (6 % CO2 et 5 % O2)	7.372
G3 (6 % CO2 et 5 % O2)	7.360

Tableau 9 : Résultats de la comparaison du pH entre les trois incubateurs du laboratoire

Les moyennes des mesures de pH sont de 7.365 pour l'incubateur G1, 7.372 pour le G2 et 7.360 pour le G3 (*tableau 9*). Pour chaque moyenne obtenue, les incertitudes de mesure calculées sont de 0.022 point de pH : toutes les valeurs mesurées sont comprises dans l'intervalle $[m - 0.022 ; m + 0.022]$. Les différences observées entre les trois incubateurs du laboratoire sont inférieures à l'incertitude de mesure et sont donc considérées comme non significatives.

Discussion

En culture embryonnaire, la régulation du pH des milieux (pHe) est assurée principalement par un système tampon à base de bicarbonates (25 -30 mM) et d'une atmosphère enrichie en CO₂, fournie par les incubateurs (Swain 2010). En cas de variations du pH extérieur, l'ovocyte et l'embryon (surtout) possèdent quelques outils intracellulaires afin de maintenir l'homéostasie de leur pH interne (pHi) autour d'une certaine valeur (environ 7.12), compatible avec leur survie et leur développement (Phillips et al. 2000). Afin d'optimiser les conditions de culture, les fournisseurs des milieux recommandent de maintenir un pHe compris entre 7.2 et 7.4. Pour cela, les incubateurs sont généralement programmés pour délivrer un taux de CO₂ autour de 5 à 6 %.

Au cours d'un processus de FIV, la maîtrise de ce paramètre critique est essentielle et nécessite un raccordement métrologique (SH GTA 05). Son suivi métrologique est habituellement indirect, grâce notamment à la surveillance en continu de la teneur en CO₂ des incubateurs. Cependant, cette méthode de suivi indirect du pH présente quelques inconvénients. En effet, plusieurs facteurs de variabilité du pHe existent au sein d'un laboratoire d'AMP et sont donc susceptibles de le perturber, sans pour autant faire varier le taux de CO₂ des incubateurs (altitude du laboratoire, changement de lot du milieu, etc.) (Gatimel et al. 2019). De même, bien que le pHi soit largement dépendant de la valeur du pHe, d'autres paramètres en culture embryonnaire sont capables de l'influencer directement : on peut citer par exemple la composition du milieu (certains acides aminés ou lactates), la température au sein des incubateurs, etc. (Gatimel et al. 2019).

Les systèmes de mesures directes du pH dans les incubateurs, tels que les systèmes portatifs, sont nombreux : l'utilisateur doit en assurer la maintenance et la certification, selon les exigences définies par le Cofrac. Une alternative est de faire appel à un appareil à gaz du sang de biologie délocalisée, dont la maintenance et la gestion des contrôles internes et externes de la qualité sont gérées par le service responsable.

Au sein de notre laboratoire, le suivi du pH du milieu de culture est indirect et repose sur la surveillance en continu du CO₂ présent dans les incubateurs, avec un taux cible fixé à 6 % selon les recommandations du fournisseur du milieu. Cependant, au vu des différents facteurs existants pouvant faire varier la valeur du pHe indépendamment du taux de CO₂ présent dans les incubateurs, nous avons voulu intégrer des contrôles réguliers de ce pH à la stratégie métrologique actuellement en place. Pour cela, nous avons cherché à valider une nouvelle méthode de mesure directe du pH de notre milieu de culture, grâce à un appareil à gaz du sang de biologie délocalisée. Cette méthode devait ensuite permettre d'étudier la corrélation entre la valeur du pHe et le CO₂ présent dans les incubateurs. En définissant une nouvelle consigne de CO₂, nous pourrions alors assurer une valeur de pH plus optimale pour nos cultures embryonnaires. Nos outils métrologiques actuels basés sur la mesure du CO₂ en continu, permettront ainsi de vérifier le respect de cette nouvelle cible.

I) Validation de méthode pour la mesure du pH

Le pH est un paramètre instable dans le temps et largement dépendant de la concentration en CO₂ environnante. Les différentes conditions de transport évaluées dans ce travail sont comparables entre elles et montrent une stabilité du pH du milieu de culture jusqu'à au moins dix minutes avant son analyse. Même si la matrice utilisée est différente, ces données sont concordantes avec celles définissant le délai recommandé pour le transport d'une seringue à gaz du sang avant analyse du pH sanguin (inférieur à 30 minutes). La proximité de l'appareil à gaz du sang avec le laboratoire d'AMP (moins de cinq minutes) est donc idéale pour permettre un délai d'acheminement approprié du milieu de culture et ainsi obtenir une mesure fiable de son pH.

D'autre part, les deux températures de transport de l'échantillon testées (température ambiante et + 4°C) n'ont pas montré d'impact sur la valeur du pH. Cependant, il a été rapporté qu'une température de transport à + 4°C rendrait plus poreux le plastique des seringues à gaz du sang par rapport à une température ambiante, favorisant ainsi davantage les échanges gazeux avec l'extérieur (*guide de la mesure du pH et des gaz du sang, clinical and laboratory standards institute 2009*). De ce fait, en cas d'utilisation de seringues en plastiques, un acheminement du milieu à température ambiante est recommandé avant l'analyse du pH.

Concernant la validation de méthode de la mesure du pH du milieu, il convenait d'évaluer les performances de cette méthode.

Pour les tests de répétabilité et de fidélité intermédiaire, les coefficients de variation obtenus (0.1 % et 0.21 % respectivement) sont conformes en comparaison avec les CV limites définis par la SFBC. Cependant, la matrice utilisée pour ces référentiels (sang) est différente de celle évaluée dans ce travail (milieu de culture). De ce fait, il existe possiblement un facteur de variabilité avec ces référentiels. D'autre part, les CV ont été calculés à partir des résultats de 12 mesures du pH, pour chaque test. Or, au moins 30 mesures sont recommandées afin d'avoir une analyse statistique optimale, selon les exigences définies par le Cofrac. Notre choix d'un nombre inférieur de mesure est justifié par le coût et les volumes de milieu consommés.

Notre étude de comparaison de méthode, entre le RP 500 et le pH-mètre, montre des résultats de pH comparables entre les deux méthodes : les différentes valeurs sont toutes comprises dans l'intervalle encadré par les limites d'agrément sur la représentation graphique de Bland-Altman. La méthode de régression linéaire n'est pas adaptée dans ce contexte car l'étendue des valeurs est trop restreinte (*Protocole assurance qualité, Constances 2014*), et la comparaison des biais entre les moyennes des deux méthodes est donc le meilleur choix (méthode de Bland-Altman). Notre évaluation souffre d'un manque de puissance, dû notamment à un manque de nombre et d'étendue de mesures (justifié par le coût du réactif), ce qui peut poser des problèmes d'interprétation des résultats. Cependant, les quatre consignes en CO₂ évaluées ici (5, 6, 7 et 9 %) permettent de couvrir une large plage de consignes de CO₂ en culture embryonnaire. Une étude similaire à celle-ci, bien qu'ayant comparée plus

d'échantillons (neuf mesures), a également utilisé une large plage de CO₂ pour ses tests (entre 3 et 7 %) (*Chansel-Debordeaux et al. 2018*). Les auteurs ont retrouvé des résultats similaires et ont conclu également à la comparabilité entre leurs deux méthodes de mesure du pH (pH-mètre et analyseur à gaz du sang).

L'étude de la contamination inter-échantillons réalisée dans ce travail n'est pas en faveur d'une contamination des valeurs basses de pH par les valeurs plus élevées. En effet, les valeurs basses B1, B2 et B3, pour chaque évaluation, sont comparables entre-elles et il n'est pas observé de tendance à la variation de ces valeurs au fur et à mesure du test. De plus, les pourcentages de contaminations calculés sont tous les deux représentés par des valeurs négatives (-3.67 % et -1.35 %). *Chansel-Debordeaux et al. (2018)* ont utilisé les mêmes consignes en CO₂ que pour une de nos évaluations (4 et 6 %) et ont conclu à un résultat similaire.

Les résultats des différents tests de performances choisis et évalués dans ce travail montrent donc que cette méthode de mesure du pH de notre milieu est juste et fiable.

II) Stabilité du pH en FIV

Dans notre étude du temps d'équilibration du pH, ce dernier semble atteindre sa valeur d'équilibre entre la sixième et la dixième heure, lorsque le milieu est incubé à + 37°C. Ces résultats sont cohérents avec les conclusions d'une autre étude (*Conaghan et al. 2008*) : un délai minimal d'incubation du milieu de six à huit heures serait nécessaire, pour une consigne donnée en CO₂. Les données fournisseurs vont également dans ce sens et recommandent une incubation du milieu la veille (pas de données horaires précises cependant).

En pratique, dans notre laboratoire, nous préparons et incubons le milieu de culture la veille de son utilisation (plus de 12 heures avant). Ce procédé donne donc largement le temps au pH d'atteindre sa valeur d'équilibre.

La consigne en CO₂ utilisée jusqu'à présent pour nos trois incubateurs K-Systems G210TM est de 6 % (consigne recommandée par le fournisseur du milieu de culture). D'après les résultats de notre étude de corrélation, cette consigne correspond à une valeur de pH acceptable pour notre milieu (7.387 en moyenne) mais située dans la limite haute de l'intervalle recommandé par le fournisseur (7.25 - 7.40). D'autre part, toutes les valeurs de pH des autres tests réalisés dans ce travail (validation de méthode, stabilité, etc.) sont également situées dans cette limite haute, lorsque le milieu était incubé sous 6 % de CO₂. Afin d'optimiser nos conditions de culture, il paraît donc plus judicieux d'augmenter cette consigne en CO₂ à 7 % de manière à obtenir une valeur de pH idéale, située autour de 7.31. Ce changement de consigne évitera également de sortir de cette fourchette de tolérance en cas d'oscillations du pH, lors de sorties et/ou de manipulations du milieu notamment. Pour cette étude de corrélation, nous n'avons pas testé les huit chambres disponibles de notre incubateur car nous sommes partis du

principe que la concentration en CO₂ était répartie de manière homogène au sein de chaque chambre d'incubation. De plus, il n'est pas recommandé de cartographier une enceinte pour le CO₂ en métrologie.

Au vu des différents paramètres existants pouvant impacter la valeur du pH d'un milieu de culture (altitude du laboratoire, composition du milieu, etc.), chaque laboratoire devrait effectuer ce genre de test afin de trouver la consigne en CO₂ la plus appropriée pour leur incubateur. Au sein d'un même laboratoire, une étude de corrélation devrait être réalisée également pour chaque type d'incubateur différent. En effet, *Chansel-Debordeaux et al. (2018)* ont trouvé des cinétiques de pH différentes pour un même milieu de culture et pour une même consigne en CO₂ appliquée dans trois incubateurs différents : à partir de leur étude de corrélation et afin d'optimiser la valeur du pH de leur milieu, ils ont ajusté leur consigne en CO₂ à 5.5 % pour l'incubateur HeracellTM, 6 % pour le K-Systems G185TM et 7 % pour le time lapse EmbryoscopeTM.

Concernant notre étude de comparabilité entre incubateurs, deux de ceux-ci ont les mêmes consignes en O₂ (5 %) et en CO₂ (6 %) : nos résultats montrent des valeurs de pH comparables entre ces deux incubateurs. Il était important de s'assurer ici d'un environnement de pH comparable entre incubateur identique.

Notre troisième incubateur possède la même consigne en CO₂ que les deux autres mais a une consigne en O₂ différente (3 % versus 5 %) : notre évaluation montre que le pH est comparable avec le pH des deux autres incubateurs. Ce troisième incubateur est utilisé pour l'incubation des embryons du troisième jour de culture jusqu'au cinquième ou sixième jour (culture prolongée) : un environnement davantage hypoxique serait bénéfique à ces stades (*Kaser et al. 2016*). Ces résultats montrent donc que des variations de concentrations d'O₂ n'ont pas d'impact sur la valeur du pH du milieu de culture. Cela est concordant avec des données de la littérature (*Webinar: Practical pH for the IVF Lab, Jason Swain 2013*).

L'incertitude de mesure choisie (0.3%), pour les tests de stress du pH et de comparaison entre incubateurs, est en réalité celle établie sur trois des quatre autres automates RP 500 délocalisés de l'hôpital (0.2 % pour le dernier).

L'incertitude de mesure du pH sur le RP 500 de la maternité n'est actuellement pas encore connue car celui-ci a été changé récemment. Cette incertitude à 0.3 % est néanmoins constante entre la majorité des autres RP 500 et permet de supposer à la comparabilité des résultats pour le nôtre.

Au cours de notre activité de routine au laboratoire, il était important d'évaluer la stabilité du pH afin de s'assurer des bonnes conditions de la culture embryonnaire. L'étude de stabilité réalisée dans ce travail retrouve des valeurs finales de pH, à J+7 d'incubation, comprises dans l'intervalle recommandé par le fournisseur (7.25 - 7.40). Le pH de notre milieu de culture reste donc stable et conforme aux cibles 7 jours à + 37°C, et ce malgré une ouverture préalable du réactif de 7 jours à + 4°C. Nous avons choisi d'évaluer la stabilité du pH en prenant des bornes de sept jours avant et sept jours après incubation du milieu, ce qui correspond en général aux temps

maximaux de stockage d'un milieu ouvert à + 4°C et de la culture embryonnaire respectivement (transfert et congélation embryonnaires avant le septième jour de culture).

Cependant, la principale limite de cette évaluation est que nous n'avons pas réalisé de mesures à T0, ni de mesures intermédiaires du pH dans les différentes conditions testées (expliqué notamment par les volumes nécessaires et le coût du réactif). De ce fait, nous ne connaissons pas l'évolution du pH au fil des jours, à + 4°C et de la mise en incubation jusqu'à sa mesure finale à J+7 (une mesure intermédiaire à J+1 de l'incubation aurait été idéale pour chaque condition évaluée). Malgré cela, nous voyons que le pH de notre milieu est correct en fin de culture (inférieur à 7.40 à J+7). *Chansel-Debordeaux et al. (2018)* ont également réalisé une étude de stabilité du pH de leur milieu de culture en mesurant celui-ci quotidiennement, de la mise en incubation du milieu jusqu'au 14^{ème} jour d'incubation. Leurs valeurs étaient toutes comprises dans l'intervalle recommandé, du 1^{er} au dernier jour du test.

Dans un laboratoire d'AMP, hors utilisation de système d'incubation avec time lapse, les sorties des embryons pour leur observation et manipulation sont nécessaires et fréquentes. Bien que les temps de sortie soient habituellement les plus réduits possibles, il nous a paru important d'évaluer expérimentalement si le pH maintenait une valeur stable ou au contraire s'il perdait sa valeur d'équilibre. Dans ce dernier cas de figure, il était intéressant d'évaluer le délai à partir duquel le pH commençait à perdre sa valeur d'équilibre. Nos résultats montrent que le pH reste compris dans l'intervalle toléré jusqu'à au moins 30 minutes lorsque le milieu, incubé sous huile, est sorti à l'air libre. Ces données sont compatibles avec notre activité puisque les temps d'observation ou de manipulation ovocytaires/embryonnaires n'excèdent pas ce délai-là. L'apport de la cloche à CO₂, pour maintenir stable la valeur du pH lors des activités de recherche ovocytaire notamment, apparaît alors limité en pratique. La principale limite de cette évaluation est que nous n'avons pas testé le maintien du pH dans des volumes réduits de milieu, utilisés pour la culture embryonnaire (microgouttes). En effet, un certain volume de milieu est requis par l'analyseur à gaz du sang (> 100 µL) pour effectuer l'analyse du pH. Dans nos conditions de culture en microgouttes, le pH du milieu pourrait évoluer différemment hors incubateur, malgré la présence d'huile de recouvrement. Nos résultats sont un peu plus optimistes que certaines données de la littérature, qui montrent une perte d'équilibre du pH plus rapide (moins de dix minutes hors incubateur) (*Conaghan et al. 2008*). Cependant, plusieurs paramètres comme des volumes différents de milieu et d'huile de recouvrement, ainsi que la nature du milieu en lui-même, pourraient expliquer ces différences dans les délais de variation du pH.

Dans ce travail, nous avons confirmé l'importance de la présence d'huile de recouvrement en culture embryonnaire afin d'assurer notamment la stabilité du pH. Dans notre évaluation de maintien du pH réalisée sans

huile de recouvrement, toutes les valeurs de pH obtenues sont non conformes car supérieures à la limite haute fixée par le fournisseur (7.40). Le pH est instable dès la sortie du milieu de l'incubateur (mesures à T0) et croît avec le temps, même lorsque le milieu est placé sous cloche à CO₂. Dans notre pratique, l'utilisation de l'huile est déjà systématique au cours des différentes préparations de boîtes de milieu, et ces résultats renforcent encore davantage son utilité. En plus d'instabilités au niveau du pH, des variations d'osmolarité du milieu, délétères également pour les ovocytes et embryons, peuvent survenir en cas d'absence d'huile de recouvrement. L'utilisation de volume de milieu de plus en plus réduit pour la culture embryonnaire (20-30 microlitres) entraîne plus d'évaporation du milieu à 37 °C et un impact encore plus important sur son osmolarité. (*Wale and Gardner 2016*).

Conclusion

Nous avons validé une nouvelle méthode de mesure directe du pH de notre milieu de culture par un analyseur à gaz du sang. Cette méthode montre des performances satisfaisantes et définit les conditions pré-analytiques.

L'étude de corrélation pH/CO₂ réalisée dans ce travail nous permet de réévaluer notre consigne en CO₂ pour les incubateurs du laboratoire : la nouvelle valeur cible est de 7 % (anciennement 6 %) et est encadrée par un écart toléré de +/- 1 % (EMT 1 %). Chaque laboratoire devrait effectuer ses propres mesures de pH et établir sa propre valeur cible en CO₂ et ses EMT. Ces contrôles réguliers du pH seront associés à la surveillance continue des nouvelles consignes en CO₂ ainsi déterminées.

A moyen terme, le suivi de certains indicateurs, comme les taux de fécondation et blastulation ou encore le taux de grossesse par transfert, pourra permettre d'évaluer l'impact de cette nouvelle méthode de mesure sur la qualité de la culture embryonnaire.

Conclusion

THÈSE SOUTENUE PAR : Quentin RENAUT

TITRE :

VALIDATION D'UN PLAN DE SUIVI MÉTROLOGIQUE DU pH EN CULTURE EMBRYONNAIRE.

CONCLUSION :

Le pH des milieux de culture embryonnaire est un paramètre critique, essentiel à maîtriser tout au long du processus de FIV afin d'assurer le meilleur développement embryonnaire possible et donc les meilleures chances de grossesse. Dans ce travail, nous avons validé une nouvelle méthode de mesure directe du pH de notre milieu de culture embryonnaire par un analyseur à gaz du sang. Nous proposons de l'inclure dans notre stratégie de surveillance métrologique actuellement en place au laboratoire. L'évaluation du pH du milieu nous donnera la consigne en CO₂ adéquate (valeur cible) que nous pourrons ensuite suivre en continu grâce aux sondes à CO₂ présentes dans les incubateurs, reliées à notre logiciel de surveillance métrologique (Sirius). L'étude de corrélation pH/CO₂ réalisée dans ce travail nous permet de définir une nouvelle consigne en CO₂ à 7 % (anciennement à 6 %) pour les incubateurs du laboratoire, correspondant à une valeur de pH plus optimisée pour notre milieu.

Il a été rapporté de possibles variations du pH lors de changement de lot d'un même milieu, et ce dans les mêmes conditions de culture (*Tarahomi et al. 2018*). De ce fait, un contrôle du pH sur l'analyseur à gaz du sang apparaît nécessaire à chaque changement de lot de notre milieu. Ensuite, pour un même lot, la fréquence des contrôles de pH peut être fixée de manière arbitraire, mensuellement (*Chansel-Debordeaux et al. 2018*) voire hebdomadaire, en fonction de l'activité du laboratoire et du personnel disponible à cette tâche. Ces contrôles pourront être faits plus souvent dans un premier temps, lors de la mise en place de la méthode. Il reviendra ensuite au biologiste responsable d'établir le calendrier de ces contrôles.

En pratique, lorsqu'un contrôle de pH est décidé, un certain volume de milieu de culture est aliquoté puis incubé sous

huile de recouvrement la veille de l'analyse (pour permettre l'équilibration du pH) sous 7 % de CO₂ dans un de nos incubateur K-Systems G210™. Puis, une première mesure du pH est effectuée le lendemain matin sur l'analyseur à gaz du sang RP 500. En cas de valeur sortant de l'intervalle recommandé par le fournisseur (7.25 – 7.40), il sera nécessaire de contrôler ce résultat par une deuxième mesure. Celle-ci pourra être réalisée le lendemain, en respectant scrupuleusement les conditions pré-analytiques afin d'écartier une éventuelle erreur de mesure à ce niveau : prélèvement du milieu dans une seringue adaptée, sans bulle d'air, fermée hermétiquement et acheminée rapidement jusqu'à l'automate. En cas de valeur confirmée non conforme, et avec l'aide de l'étude de corrélation réalisée, la consigne en CO₂ de l'incubateur sera modifiée de 1 % (modification du pH d'environ 0.5 à 0.7 point). Toute nouvelle consigne en CO₂ entrainera un contrôle du pH le lendemain selon les mêmes conditions pré-analytiques vues précédemment. La nouvelle valeur cible en CO₂ sera encadrée par un écart toléré de +/- 1 % (EMT 1 %). Ces bornes de CO₂ à 1% de la valeur cible correspondront à des valeurs de pH acceptables, situées dans l'intervalle recommandé par le fournisseur (étude de corrélation).

Le suivi en continu du CO₂ restera intéressant puisqu'il permettra, notamment, de surveiller une éventuelle défaillance dans l'arrivée de gaz dans l'incubateur (problème technique, panne de l'électrovanne, etc...). En cas de concentration en CO₂ se situant en dehors de l'intervalle encadré par les EMT, le personnel du laboratoire pourra être alerté. La formation du personnel à cette nouvelle activité devra être mise en place. Bien que le temps dédié à ces contrôles de pH puisse paraître conséquent en plus de l'activité de routine du laboratoire, ils permettront très certainement d'optimiser les conditions de culture embryonnaire et ainsi améliorer les taux de grossesse des couples suivis en AMP.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le : 15/07/2021

LE DOYEN



Pr. Patrice MORAND

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE



Pr. HENNEBICQ Sylviane

Bibliographie

Albert C, Gonzalez N, Marcos J, Alegre L, Ruiz BA, De Los Santos JM, et al. The effect of high humidity culture conditions over embryo development: a continuous embryo monitoring assessment. *Reproductive BioMedicine Online*. mai 2018;37:e15-6.

As et al. Gametes alter the oviductal secretory proteome. *Mol Cell Proteomics*. 16 août 2005;4(11):1785-96.

Awonuga A, Yang Y, Rappolee D. When Stresses Collide. *Biology of reproduction*. 14 août 2013;89.

Bahat A, Caplan SR, Eisenbach M. Thermotaxis of Human Sperm Cells in Extraordinarily Shallow Temperature Gradients Over a Wide Range. *PLOS ONE*. 25 juill 2012;7(7):e41915.

Baltz JM. Media Composition: Salts and Osmolality. In: Smith GD, Swain JE, Pool TB, éditeurs. *Embryo Culture* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2012 [cité 14 mai 2021]. p. 61-80. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-971-6_5

Barr KJ, Garrill A, Jones DH, Orlowski J, Kidder GM. Contributions of Na⁺/H⁺ exchanger isoforms to preimplantation development of the mouse. *Mol Reprod Dev*. juin 1998;50(2):146-53.

Bavister BD, Squirrell JM. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Hum Reprod*. juill 2000;15 Suppl 2:189-98.

Biggers JD. Thoughts on embryo culture conditions. *Reproductive BioMedicine Online*. janv 2002;4:30-8.

Biggers JD, Racowsky C. The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM(AA) medium: is a two-step protocol necessary? *Reprod Biomed Online*. oct 2002;5(2):133-40.

Bontekoe S, Johnson N, Blake D. Adherence compounds in embryo transfer media for assisted reproductive technologies. *Cochrane Gynaecology and Fertility Group*, éditeur. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. 25 févr 2014 [cité 14 mai 2021]; Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD007421.pub3>

Bontekoe S, Mantikou E, van Wely M, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst Rev*. 11 juill 2012;(7):CD008950.

Boone WR, Higdon HL, Johnson JE. Quality Management Issues in the Assisted Reproduction Laboratory. *Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology*. juin 2010;1(1):30-107.

Bromfield EG, McLaughlin EA, Aitken RJ, Nixon B. Heat Shock Protein member A2 forms a stable complex with angiotensin converting enzyme and protein disulfide isomerase A6 in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. févr 2016;22(2):93-109.

Brook PF, Lawry J, Cooke ID, Barratt CL. Measurement of intracellular pH in human spermatozoa by flow cytometry with the benzo[c]xanthene dye SNAFL-1: a novel, single excitation, dual emission, molecular probe. *Mol Hum Reprod*. janv 1996;2(1):18-25.

Busa WB. Mechanisms and Consequences of pH-Mediated Cell Regulation. :18.

Butler JE, Lechene C, Biggers JD. Noninvasive measurement of glucose uptake by two populations of murine embryos. *Biol Reprod*. nov 1988;39(4):779-86.

Caballero-Campo P, Buffone MG, Benencia F, Conejo-García JR, Rinaudo PF, Gerton GL. A role for the chemokine receptor CCR6 in mammalian sperm motility and chemotaxis. *J Cell Physiol*. janv 2014;229(1):68-78.

Chansel-Debordeaux L, Dagorne V, Mercier M, Soula V, Chauzit E, Dabernat S, et al. Validation de la mesure d'un paramètre critique en culture d'embryons humains : le pH. *Ann Biol Clin*. 2018;76:9.

Chen AA, Tan L, Suraj V, Reijo Pera R, Shen S. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. *Fertil Steril*. 15 mars 2013;99(4):1035-43.

Chronopoulou E, Harper JC. IVF culture media: past, present and future. *Human Reproduction Update*. 1 janv 2015;21(1):39-55.

Cohen J, Gilligan A, Willadsen S. Culture and quality control of embryos. *Hum Reprod*. juin 1998;13 Suppl 3:137-44; discussion 145-147.

Cohen J, Gilligan A, Esposito W, Schimmel T, Dale B. Ambient air and its potential effects on conception in vitro. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1 sept 1997;12:1742-9.

Consensus Group C. 'There is only one thing that is truly important in an IVF laboratory: everything' Cairo Consensus Guidelines on IVF Culture Conditions. *Reproductive BioMedicine Online*. janv 2020;40(1):33-60.

Dale B, Menezo Y, Cohen J, DiMatteo L, Wilding M. Intracellular pH regulation in the human oocyte. :7.

Desai N, Ludgin J, Sharma R, Anirudh RK, Agarwal A. Female and Male Gametogenesis. In: Falcone T, Hurd WW, éditeurs. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery [Internet]*. New York, NY: Springer New York; 2013 [cité 14 mai 2021]. p. 43-62. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-6837-0_3

Dickens CJ, Maguiness SD, Comer MT, Palmer A, Rutherford AJ, Leese HJ. Human tubal fluid: formation and composition during vascular perfusion of the fallopian tube. *Hum Reprod*. mars 1995;10(3):505-8.

Dumoulin JC, Land JA, Van Montfoort AP, Nelissen EC, Coonen E, Derhaag JG, et al. Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns. *Hum Reprod*. mars 2010;25(3):605-12.

Ebner T, Shebl O, Moser M, Mayer RB, Arzt W, Tews G. Group culture of human zygotes is superior to individual culture in terms of blastulation, implantation and life birth. *Reprod Biomed Online*. déc 2010;21(6):762-8.

Edwards LJ, Williams DA, Gardner DK. Intracellular pH of the preimplantation mouse embryo: effects of extracellular pH and weak acids. *Mol Reprod Dev*. août 1998;50(4):434-42.

Edwards LJ, Williams DA, Gardner DK. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Hum Reprod*. déc 1998;13(12):3441-8.

Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Fertilization and Cleavage in vitro of Preovulator Human Oocytes. *Nature*. sept 1970;227(5265):1307-9.

Erdogan S, FitzHarris G, Tartia AP, Baltz JM. Mechanisms regulating intracellular pH are activated during growth of the mouse oocyte coincident with acquisition of meiotic competence. *Dev Biol*. 1 oct 2005;286(1):352-60.

Fawzy M, Emad M, AbdelRahman MY, Abdelghafar H, Abdel Hafez FF, Bedaiwy MA. Impact of 3.5% O₂ culture on embryo development and clinical outcomes: a comparative study. *Fertil Steril*. oct 2017;108(4):635-41.

Fawzy M, Emad M, Gad MA, Sabry M, Kasem H, Mahmoud M, et al. Comparing 36.5°C with 37°C for human embryo culture: a prospective randomized controlled trial. *Reprod Biomed Online*. juin 2018;36(6):620-6.

Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil*. nov 1993;99(2):673-9.

FitzHarris G, Baltz JM. Granulosa cells regulate intracellular pH of the murine growing oocyte via gap junctions: development of independent homeostasis during oocyte growth. *Development*. 15 févr 2006;133(4):591-9.

FitzHarris G, Siyanov V, Baltz JM. Granulosa cells regulate oocyte intracellular pH against acidosis in preantral follicles by multiple mechanisms. *Development*. 1 déc 2007;134(23):4283-95.

Fraser IS, Baird DT, Cockburn F. Ovarian venous blood PO₂, PCO₂ and pH in women. *J Reprod Fertil*. avr 1973;33(1):11-7.

Gardner DK, Lane M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod.* juin 1998;13 Suppl 3:148-59; discussion 160.

Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril.* févr 1996;65(2):349-53.

Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri RD. Need for choosing the ideal pH value for IVF culture media. *J Assist Reprod Genet.* mai 2020;37(5):1019-28.

Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer.* 9 sept 2014;111(6):1021-46.

Grinsted J, Kjer JJ, Blendstrup K, Pedersen JF. Is low temperature of the follicular fluid prior to ovulation necessary for normal oocyte development? *Fertil Steril.* janv 1985;43(1):34-9.

Gruber I, Klein M. Embryo culture media for human IVF: which possibilities exist? *J Turkish German Gynecol Assoc.* 1 juin 2011;12(2):110-7.

Hagen DR, Prather RS, Sims MM, First NL. Development of one-cell porcine embryos to the blastocyst stage in simple media. *Journal of Animal Science.* 1 mars 1991;69(3):1147-50.

Hamamah S, Magnoux E, Royere D, Barthelemy C, Dacheux JL, Gatti JL. Internal pH of human spermatozoa: effect of ions, human follicular fluid and progesterone. *Mol Hum Reprod.* avr 1996;2(4):219-24.

Harris SE, Gopichandran N, Picton HM, Leese HJ, Orsi NM. Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology.* 1 sept 2005;64(4):992-1006.

Hong KH, Lee H, Forman EJ, Upham KM, Scott RT. Examining the temperature of embryo culture in in vitro fertilization: a randomized controlled trial comparing traditional core temperature (37°C) to a more physiologic, cooler temperature (36°C). *Fertil Steril.* sept 2014;102(3):767-73.

Hugentobler S, Morris DG, Kane MT, Sreenan JM. In situ oviduct and uterine pH in cattle. *Theriogenology.* mai 2004;61(7-8):1419-27.

Hunter RHF. Temperature gradients in female reproductive tissues. *Reprod Biomed Online.* avr 2012;24(4):377-80.

Iritani A, Gomes WR, Vandemark NL. Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in ewes. *Biol Reprod.* avr 1969;1(1):72-6.

Jacques A, Marie KJ, Françoise C, Pierre J. Decline in Semen Quality among Fertile Men in Paris during the Past 20 Years. *The New England Journal of Medicine.* 1995;332(5):5.

John DP, Kiessling AA. Improved pronuclear mouse embryo development over an extended pH range in Ham's F-10 medium without protein. *Fertil Steril.* janv 1988;49(1):150-5.

Johnson MH, Pickering SJ, George MA. The influence of cooling on the properties of the zona pellucida of the mouse oocyte. *Hum Reprod.* avr 1988;3(3):383-7.

Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, Ulug U, Bahçeci M. Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. *Reprod Biomed Online.* oct 2004;9(4):409-17.

Kaser DJ, Bogale B, Sarda V, Farland LV, Williams PL, Racowsky C. Randomized controlled trial of low (5%) versus ultralow (2%) oxygen for extended culture using bipronucleate and tripronucleate human preimplantation embryos. *Fertility and Sterility.* juin 2018;109(6):1030-1037.e2.

Khoudja RY, Xu Y, Li T, Zhou C. Better IVF outcomes following improvements in laboratory air quality. *J Assist Reprod Genet.* janv 2013;30(1):69-76.

Kleijkers SHM, Mantikou E, Slappendel E, Consten D, van Echten-Arends J, Wetzels AM, et al. Influence of

embryo culture medium (G5 and HTF) on pregnancy and perinatal outcome after IVF: a multicenter RCT. *Hum Reprod.* oct 2016;31(10):2219-30.

Kousta G, Sjoblom C. O-195 Epigenetic consequences of pH stress in mouse embryos. *Human Reproduction [Internet]*. 2011 [cité 2 mars 2021];26(suppl_1). Disponible sur: insights.ovid.com

Lane M, Baltz JM, Bavister BD. Na⁺/H⁺ antiporter activity in hamster embryos is activated during fertilization. *Dev Biol.* 1 avr 1999;208(1):244-52.

Lane M, Baltz JM, Bavister BD. Bicarbonate/chloride exchange regulates intracellular pH of embryos but not oocytes of the hamster. *Biol Reprod.* août 1999;61(2):452-7.

Lane M, Gardner DK. Regulation of ionic homeostasis by mammalian embryos. *Semin Reprod Med.* 2000;18(2):195-204.

Lane M, Gardner DK. Inhibiting 3-phosphoglycerate kinase by EDTA stimulates the development of the cleavage stage mouse embryo. *Mol Reprod Dev.* oct 2001;60(2):233-40.

Lane M, Baltz JM, Bavister BD. Regulation of Intracellular pH in Hamster Preimplantation Embryos by the Sodium Hydrogen (Na⁺/H⁺) Antiporter1. *Biology of Reproduction.* 1 déc 1998;59(6):1483-90.

Lane M, Gardner DK. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod.* oct 2003;69(4):1109-17.

Leese HJ. The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil.* mars 1988;82(2):843-56.

Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG, Sturmey RG. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod.* déc 2008;14(12):667-72.

Legro RS, Sauer MV, Mottla GL, Richter KS, Li X, Dodson WC, et al. Effect of air quality on assisted human reproduction. *Human reproduction (Oxford, England).* mai 2010;25(5):1317-24.

Lengner CJ, Gimelbrant AA, Erwin JA, Cheng AW, Guenther MG, Welstead GG, et al. Derivation of Pre-X Inactivation Human Embryonic Stem Cells under Physiological Oxygen Concentrations. *Cell.* mai 2010;141(5):872-83.

Li R, Liu Y, Pedersen HS, Callesen H. Effect of ambient light exposure of media and embryos on development and quality of porcine parthenogenetically activated embryos. *Zygote.* juin 2015;23(3):378-83.

Li S, Winuthayanon W. Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *Journal of Endocrinology.* janv 2017;232(1):R1-26.

Li W, Goossens K, Van Poucke M, Forier K, Braeckmans K, Van Soom A, et al. High oxygen tension increases global methylation in bovine 4-cell embryos and blastocysts but does not affect general retrotransposon expression. *Reprod Fertil Dev.* juin 2016;28(7):948-59.

Mahadevan MM, Fleetham J, Church RB, Taylor PJ. Growth of mouse embryos in bicarbonate media buffered by carbon dioxide, hepes, or phosphate. *J Assist Reprod Genet.* 1 oct 1986;3(5):304-8.

Masson E. Assistance médicale à la procréation : principaux aspects biologiques, médicaux et éthiques [Internet]. EM-Consulte. [cité 1 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/224997/assistance-medicaire-a-la-procreation-principaux-as>

Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, et al. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Hum Reprod.* févr 2009;24(2):300-7.

Merton JS, Vermeulen ZL, Otter T, Mullaart E, de Ruigh L, Hasler JF. Carbon-activated gas filtration during in vitro culture increased pregnancy rate following transfer of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology.* 15 avr 2007;67(7):1233-8.

Miki K, Clapham DE. Rheotaxis Guides Mammalian Sperm. *Current Biology*. mars 2013;23(6):443-52.

Morbeck DE, Baumann NA, Oglesbee D. Composition of single-step media used for human embryo culture. *Fertility and Sterility*. 1 avr 2017;107(4):1055-1060.e1.

Morbeck DE, Krisher RL, Herrick JR, Baumann NA, Matern D, Moyer T. Composition of commercial media used for human embryo culture. *Fertil Steril*. sept 2014;102(3):759-766.e9.

Morbeck DE, Leonard PH. Culture systems: mineral oil overlay. *Methods Mol Biol*. 2012;912:325-31.

Morin SJ. Oxygen tension in embryo culture: does a shift to 2% O₂ in extended culture represent the most physiologic system? *J Assist Reprod Genet*. mars 2017;34(3):309-14.

Mortimer D, Cohen J, Mortimer ST, Fawzy M, McCulloh DH, Morbeck DE, et al. Cairo consensus on the IVF laboratory environment and air quality: report of an expert meeting. *Reprod Biomed Online*. juin 2018;36(6):658-74.

Nakayama T, Noda Y, Goto Y, Mori T. Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenology*. févr 1994;41(2):499-510.

Nastri CO, Nóbrega BN, Teixeira DM, Amorim J, Diniz LMM, Barbosa MWP, et al. Low versus atmospheric oxygen tension for embryo culture in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. juill 2016;106(1):95-104.e17.

Ng KYB, Mingels R, Morgan H, Macklon N, Cheong Y. In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 1 janv 2018;24(1):15-34.

Nielsen HI, Ali J. Embryo Culture Media, Culture Techniques and Embryo Selection: A Tribute to Wesley Kingston Whitten. *Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology*. juin 2010;1(1):1-29.

Oh SJ, Gong SP, Lee ST, Lee EJ, Lim JM. Light intensity and wavelength during embryo manipulation are important factors for maintaining viability of preimplantation embryos in vitro. *Fertil Steril*. oct 2007;88(4 Suppl):1150-7.

Ordre des chimistes du Québec. Guide sur les gaz sanguins, le pH et les paramètres connexes. 2018.

Oren-Benaroya R, Orvieto R, Gakamsky A, Pinchasov M, Eisenbach M. The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Human Reproduction*. 1 oct 2008;23(10):2339-45.

Otsuki J, Nagai Y, Chiba K. Peroxidation of mineral oil used in droplet culture is detrimental to fertilization and embryo development. *Fertil Steril*. sept 2007;88(3):741-3.

Otsuki J, Nagai Y, Chiba K. Damage of embryo development caused by peroxidized mineral oil and its association with albumin in culture. *Fertil Steril*. mai 2009;91(5):1745-9.

Ottosen LDM, Hindkjær J, Ingerslev J. Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures. *J Assist Reprod Genet*. 5 avr 2007;24(2-3):99-103.

Ozawa M, Nagai T, Kaneko H, Noguchi J, Ohnuma K, Kikuchi K. Successful pig embryonic development in vitro outside a CO₂ gas-regulated incubator: Effects of pH and osmolality. *Theriogenology*. 1 mars 2006;65:860-9.

Pantaleon M, Scott J, Kaye P. Nutrient Sensing by the Early Mouse Embryo: Hexosamine Biosynthesis and Glucose Signaling During Preimplantation Development. *Biology of reproduction*. 1 mai 2008;78:595-600.

Paria BC, Dey SK. Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. juin 1990;87(12):4756-60.

Patrat C, Serres C. La capacitation in vivo : influence de l'environnement féminin. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. juin 2009;37(6):536-9.

- Perin PM, Maluf M, Czeresnia CE, Januário DANF, Saldiva PHN. Impact of short-term preconceptional exposure to particulate air pollution on treatment outcome in couples undergoing in vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET). *J Assist Reprod Genet.* juill 2010;27(7):371-82.
- Perreault SD, Rogers BJ. Capacitation pattern of human spermatozoa**Supported by Grant HD 11555 from the National Institutes of Health, United States Public Health Service, Bethesda, Maryland. *Fertility and Sterility.* 1 août 1982;38(2):258-60.
- Phillips KP. Intracellular pH regulation in human preimplantation embryos. *Human Reproduction.* 1 avr 2000;15(4):896-904.
- Phillips KP, Baltz JM. Intracellular pH Regulation by HCO₃⁻/Cl⁻ Exchange Is Activated during Early Mouse Zygote Development. *Developmental Biology.* avr 1999;208(2):392-405.
- Phillips KP, Petrunewich MAF, Collins JL, Baltz JM. The Intracellular pH-regulatory HCO₃⁻/Cl⁻ Exchanger in the Mouse Oocyte Is Inactivated during First Meiotic Metaphase and Reactivated after Egg Activation via the MAP Kinase Pathway. *Guidotti G, éditeur. MBoC.* nov 2002;13(11):3800-10.
- Pomeroy KO, Reed ML. The Effect of Light on Embryos and Embryo Culture. *Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology.* déc 2012;3(2):46-54.
- Quinn P, Moinipanah R, Steinberg JM, Weathersbee PS. Successful human in vitro fertilization using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate ions. *Fertil Steril.* avr 1995;63(4):922-4.
- Rijnders PM, Jansen CAM. Influence of group culture and culture volume on the formation of human blastocysts: a prospective randomized study. *Human Reproduction.* sept 1999;14(9):2333-7.
- Roos A, Boron WF. Intracellular pH. *Physiol Rev.* avr 1981;61(2):296-434.
- Schmidt C. Stability of pO₂, pCO₂ and pH in Heparinized Whole Blood Samples: Influence of Storage Temperature with Regard to Leukocyte Count and Syringe Material. :8.
- Schneider M, Marison IW, von Stockar U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J Biotechnol.* 15 mai 1996;46(3):161-85.
- Shalgi R, Kraicer PF, Soferman N. Human follicular fluid. *J Reprod Fertil.* déc 1972;31(3):515-6.
- Sifer C, Mour P, Tranchant S, Visentin E, Hafhouf E, Sermondade N, et al. Y a-t-il un intérêt à utiliser un milieu de transfert embryonnaire enrichi en acide hyaluronique lors de tentatives de FIV/ICSI? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité.* nov 2009;37(11-12):884-9.
- Squirrell JM, Lane M, Bavister BD. Altering intracellular pH disrupts development and cellular organization in preimplantation hamster embryos. *Biol Reprod.* juin 2001;64(6):1845-54.
- Squirrell JM, Lane M, Bavister BD. Altering Intracellular pH Disrupts Development and Cellular Organization in Preimplantation Hamster Embryos. 2016;26.
- Sr B, G F-F, Aa A, Me W. In vitro maturation of ovine oocytes in a portable incubator. *Theriogenology.* 1 mars 1997;47(4):857-64.
- Steel T, Conaghan J. pH Equilibration Dynamics of Culture Medium Under Oil. *Fertility and Sterility.* avr 2008;89(4):S27.
- Sun X-F, Zhang W-H, Chen X-J, Xiao G-H, Mai W-Y, Wang W-H. Spindle dynamics in living mouse oocytes during meiotic maturation, ageing, cooling and overheating: a study by polarized light microscopy. *Zygote.* août 2004;12(3):241-9.
- Sund-Levander M, Forsberg C, Wahren LK. Normal oral, rectal, tympanic and axillary body temperature in adult men and women: a systematic literature review. *Scand J Caring Sci.* juin 2002;16(2):122-8.

Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*. avr 2010;139(4):685-95.

Swain JE. Is there an optimal pH for culture media used in clinical IVF? :7.

Swain J. Optimal Human Embryo Culture. *Semin Reprod Med*. 3 mars 2015;33(02):103-17.

Swain JE. Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality. *Reproductive BioMedicine Online*. juill 2010;21(1):6-16.

Swain JE. Decisions for the IVF laboratory: comparative analysis of embryo culture incubators. *Reproductive BioMedicine Online*. 1 mai 2014;28(5):535-47.

Swain JE, Pool TB. New pH-buffering system for media utilized during gamete and embryo manipulations for assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. juin 2009;18(6):799-810.

Swearman H, Koustas G, Knight E, Liperis G, Grupen C, Sjoblom C. pH: the silent variable significantly impacting meiotic spindle assembly in mouse oocytes. *Reprod Biomed Online*. sept 2018;37(3):279-90.

Tao T, Robichaud A, Mercier J, Ouellette R. Influence of group embryo culture strategies on the blastocyst development and pregnancy outcome. *J Assist Reprod Genet*. janv 2013;30(1):63-8.

Tarahomi M. pH stability of human preimplantation embryo culture media: effects of culture and batches. :6.

Thomas T. Culture systems: air quality. *Methods Mol Biol*. 2012;912:313-24.

Thouas GA, Dominguez F, Green MP, Vilella F, Simon C, Gardner DK. Soluble ligands and their receptors in human embryo development and implantation. *Endocr Rev*. févr 2015;36(1):92-130.

Tucker KE, Hurst BS, Guadagnoli S, Dymecki C, Mendelsberg B, Awoniyi CA, et al. Evaluation of synthetic serum substitute versus serum as protein supplementation for mouse and human embryo culture. *J Assist Reprod Genet*. janv 1996;13(1):32-7.

Wale PL, Gardner DK. Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients. *Reprod Biomed Online*. sept 2010;21(3):402-10.

Wale PL, Gardner DK. Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development. *Biol Reprod*. juill 2012;87(1):24, 1-8.

Wale PL, Gardner DK. Oxygen Affects the Ability of Mouse Blastocysts to Regulate Ammonium¹. *Biology of Reproduction* [Internet]. 1 sept 2013 [cité 14 mai 2021];89(3). Disponible sur: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.113.109256>

Wale PL, Gardner DK. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod Update*. janv 2016;22(1):2-22.

Wang W-H, Meng L, Hackett RJ, Oldenbourg R, Keefe DL. Rigorous thermal control during intracytoplasmic sperm injection stabilizes the meiotic spindle and improves fertilization and pregnancy rates. *Fertility and Sterility*. 1 juin 2002;77(6):1274-7.

Wang W-H, Meng L, Hackett RJ, Oldenbourg R, Keefe DL. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling–rearming observed using polarized light microscopy. *Human Reproduction*. 1 nov 2001;16(11):2374-8.

Watson AJ, Barcroft LC. Regulation of blastocyst formation. *Front Biosci*. 1 mai 2001;6:D708-730.

Wiwanitkit V. Glass syringes are better than plastic for preserving arterial blood gas for oxygen partial pressure determination: an explanation based on nanomaterial composition. *International Journal of Nanomedicine*. janv 2006;1(2):223-4.

Xie Y, Wang F, Puscheck EE, Rappolee DA. Pipetting causes shear stress and elevation of phosphorylated stress-activated protein kinase/jun kinase in preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* oct 2007;74(10):1287-94.

Xie Y, Wang F, Zhong W, Puscheck E, Shen H, Rappolee DA. Shear stress induces preimplantation embryo death that is delayed by the zona pellucida and associated with stress-activated protein kinase-mediated apoptosis. *Biol Reprod.* juill 2006;75(1):45-55.

Yedwab GA, Paz G, Homonnai TZ, David MP, Kraicer PF. The Temperature, pH, and Partial Pressure of Oxygen in the Cervix and Uterus of Women and Uterus of Rats During the Cycle. *Fertility and Sterility.* mars 1976;27(3):304-9.

Youssef MM, Mantikou E, van Wely M, Van der Veen F, Al-Inany HG, Repping S, et al. Culture media for human pre-implantation embryos in assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Gynaecology and Fertility Group, éditeur. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet].* 20 nov 2015 [cité 14 mai 2021]; Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD007876.pub2>

Zander DL, Thompson JG, Lane M. Perturbations in mouse embryo development and viability caused by ammonium are more severe after exposure at the cleavage stages. *Biol Reprod.* févr 2006;74(2):288-94.

Zander-Fox DL, Mitchell M, Thompson JG, Lane M. 404. Repercussions of a transient decrease in pH on embryo viability and subsequent fetal development. *Reprod Fertil Dev.* 28 août 2008;20(9):84-84.

Zhang JQ, Li XL, Peng Y, Guo X, Heng BC, Tong GQ. Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. *Reprod Biomed Online.* avr 2010;20(4):510-5.

Zhao Y, Chauvet PJ, Alper SL, Baltz JM. Expression and function of bicarbonate/chloride exchangers in the preimplantation mouse embryo. *J Biol Chem.* 13 oct 1995;270(41):24428-34.

Zorn TM, Pinhal MA, Nader HB, Carvalho JJ, Abrahamsohn PA, Dietrich CP. Biosynthesis of glycosaminoglycans in the endometrium during the initial stages of pregnancy of the mouse. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* févr 1995;41(1):97-106.

2017 Assisted Reproductive Technology Fertility Clinic Success Rates Report. 2017;585.

College National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF), Conférence nationale des PU-PH en Gynécologie-Obstétrique. Item 30 : Assistance médicale à la procréation : principaux aspects biologiques, médicaux et éthiques. In: *Gynécologie Obstétrique.* Issy-les-Moulineaux: Masson; 2006. p. 43-50.

Arrêté du 30 juin 2017 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 modifié relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation.

COFRAC. SH-REF-02 : exigences pour l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189. Révision 05, 2016.

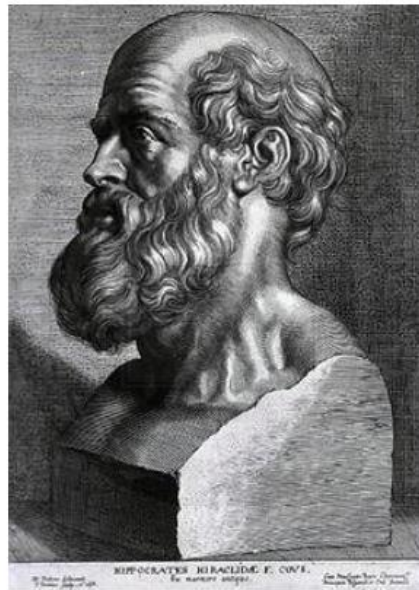
COFRAC. SH GTA 04 : guide technique d'accréditation de vérification(portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. Révision 01, 2015.

COFRAC. SH GTA 05 : guide technique d'accréditation en biologie de la reproduction. Révision 00, 2016.

Guide de la mesure du pH et des gaz du sang, clinical and laboratory standards institute 2009.

Protocole assurance qualité, Constances 2014.

Vassault A, Grafmeyer D, de Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation des techniques. *Ann Biol Clin* 1999 ; 57 : 685-95.



SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Résumé

Au sein d'un laboratoire d'aide médicale à la procréation, la qualité du développement embryonnaire est étroitement liée aux conditions environnementales auxquelles les embryons sont exposés, notamment dans les incubateurs. Le pH des milieux de culture est un des paramètres critiques essentiel à maîtriser en culture embryonnaire. L'objectif principal de ce travail est la validation de méthode de la mesure du pH de notre milieu de culture embryonnaire par un analyseur à gaz du sang. Les objectifs secondaires sont l'évaluation de différentes conditions pouvant faire varier la valeur de ce pH au laboratoire : manipulations du milieu, temps d'incubation du milieu, présence d'huile de recouvrement, teneur en CO₂ des incubateurs.

Nous avons choisi d'utiliser un analyseur à gaz du sang de biologie délocalisée (RapidPoint 500) pour effectuer les mesures de pH. Le milieu de culture évalué est le Continuous Single Culture Complete (CSCM-C®) de chez IrvineScientific et les incubateurs testés sont les incubateurs K-Systems G210™. Afin de valider cette nouvelle méthode de mesure du pH, des tests de stress du pH suivis d'une évaluation des performances de la méthode ont été réalisés, conformément aux exigences du COFRAC.

Les tests de performance réalisés dans ce travail montrent de bons résultats et permettent ainsi la validation de la méthode. L'étude de corrélation entre le pH du milieu de culture et le taux de CO₂ des incubateurs a permis de définir une nouvelle valeur cible de CO₂ pour les incubateurs du laboratoire : le nouveau taux optimal est de 7 % avec des EMT correspondants de +/- 1 %.

Cette nouvelle méthode de mesure du pH de notre milieu s'intégrera parfaitement dans la stratégie métrologique actuellement en place au laboratoire. Des contrôles réguliers du pH, établis selon une fréquence définie par le biologiste responsable, permettront d'adapter au mieux la teneur en CO₂ des incubateurs et participeront ainsi à l'optimisation des conditions de culture embryonnaire.