

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le Vendredi 5 Octobre 2018

Par Mme CRISTIANI Florence
Né(e) le 23 Décembre 1987

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

**Culture embryonnaire et stratégie de transfert :
Etude rétrospective au laboratoire de l'hôpital Antoine Béclère
(AP-HP) entre Janvier 2014 et Décembre 2016.**

----oOo----

JURY :

Président : Madame le Professeur Nathalie BARDIN

Membres : Madame le Professeur Nelly ACHOUR-FRYDMAN

Madame le Professeur Catherine GUILLEMAIN

Madame le Professeur Jeanne PERRIN

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05

Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen :

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE

Vice-Doyens :

M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHÉLOT

Chargés de Mission :

Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI

Conseiller du Doyen :

M. Patrice VANELLE

Doyens honoraires :

M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE

Professeurs émérites :

M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL

Professeurs honoraires :

M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI

Chef des Services Administratifs :

Mme Florence GAUREL

Chef de Cabinet :

Mme Aurélie BELENGUER

Responsable de la Scolarité :

Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémie MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI
M. Thierry AUGIER
M. Edouard LAMY
Mme Alexandrine BERTAUD
Mme Claire CERINI
Mme Edwige TELLIER
M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Aurélie LEROYER
M. Romaric LACROIX
Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

Mme Michèle LAGET
M. Michel DE MEO
Mme Anne DAVIN-REGLI
Mme Véronique ROUX
M. Fadi BITTAR
Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD
M. Seydina Mouhamadou DIENE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

M. Maxime LOYENS

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Philippe GALLICE

CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE

M. Pascal RATHÉLOT
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE
M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL
Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine DEFOORT
M. Alain NICOLAY
Mme Estelle WOLFF
Mme Elise LOMBARD
Mme Camille DESGROUAS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC
M. Pierre REBOUILLO

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT
Mme Caroline DUCROS
M. Marc MONTANA
Mme Manon ROCHE

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE
HYDROLOGIE

M. Armand GELLIS
M. Christophe CURTI
Mme Julie BROGGI
M. Nicolas PRIMAS
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

M. Riad ELIAS
Mme Valérie MAHIOU-LEDDET
Mme Sok Siya BUN
Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Cyril PUJOL

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE

M. Marc LAMBERT

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET
COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET
GESTION DE LA PHARMAFAC

Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

M. Mathieu CERINO

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE

M. Charles DESMARCHELIER

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE

Mme Diane BRAGUER
M. Stéphane HONORÉ

PHARMACODYNAMIE

M. Benjamin GUILLET

TOXICOLOGIE GENERALE

M. Bruno LACARELLE

TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE

M. Guillaume HACHE
Mme Ahlem BOUHLEL
M. Philippe GARRIGUE

PHYSIOLOGIE

Mme Sylviane LORTET
Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL

TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE

M. Joseph CICCOLINI
Mme Raphaëlle FANCIULLINO
Mme Florence GATTACECCA

TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE

M. Pierre-Henri VILLARD
Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU
Mme Marie-Anne ESTEVE**A.H.U.**

PHARMACIE CLINIQUE

M. Florian CORREARD

PHARMACOCINETIQUE

Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire
Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie
Mme Clémence TABLE, Pharmacien-Praticien attaché
Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier
M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

REMERCIEMENTS

Je remercie respectueusement :

Madame le Professeur Nathalie Bardin, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier, de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Madame le Professeur Nelly Achour-Frydman, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier, d'avoir accepté de m'encadrer dans ce travail de thèse. Je vous remercie également de m'avoir accueillie dans votre équipe pendant 6 mois, avec toute la gentillesse et la bienveillance dont vous faîte preuve au quotidien. C'est un plaisir de travailler à vos côtés. Merci de m'avoir donné de votre temps si précieux et pour tout ce que vous m'avez appris, tant au niveau professionnel qu'au niveau humain, j'en suis ressortie grandi.

Madame le Professeur Catherine Guillemain, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier et Chef de service, d'avoir accepté de juger mon travail et de participer au jury de cette thèse. Je vous remercie de m'avoir intégrée dans votre équipe en tant qu'interne et de m'avoir proposé de poursuivre mon chemin avec vous. Merci pour votre confiance, que notre collaboration future au sein du laboratoire soit des plus fructueuses.

Madame le Professeur Jeanne Perrin, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier, d'avoir accepté de juger mon travail et de participer au jury de cette thèse. Je te remercie pour tes conseils depuis mes premiers jours au laboratoire. J'admire le dynamisme qui t'anime et tous les projets que tu entreprends. J'espère que tu continueras à me transmettre ton savoir encore quelques années.

Après 13ans d'études et 30ans de vie, il y en a du monde à remercier...

Je remercie affectueusement :

Toute l'équipe du **CPMA** de la Conception, qui m'a permis de découvrir le monde extraordinaire de la biologie de la reproduction. Merci à chacun(e) d'entre vous de m'avoir formée, tant au niveau technique que relationnel. J'ai appris à accompagner les couples dans leur parcours, en essayant de trouver les mots justes à chaque consultation, à faire face à leurs émotions et leurs nombreuses questions et à les rassurer quand il le faut. Tout cela, c'est grâce à vous !

J'espère que je serai à la hauteur du poste qui m'attend.

M. Grillo pour tous les jeudis après-midi passés en consultation, ce n'était pas gagné mais grâce à vous j'ai réussi à vaincre ma timidité, **Catherine** pour votre disponibilité et pour m'avoir guidée pendant ces 2 années, **Jacky P** pour ta gentillesse, tes conseils de management et toutes mes impressions (!), **Odile** pour ton calme, ta gentillesse et ton aide depuis le premier jour, **Jackie S** pour tes conseils avisés que je ne manquerai pas d'appliquer, **Lila** et **Elodie** pour votre sympathie, **Carole** pour ta bonne humeur et tous les conseils que tu as pu me donner, **Marine** et **Pauline** merci pour vos sourires et toutes nos discussions, j'ai beaucoup appris grâce à vous et je suis ravie de travailler à vos côtés.

Nathalie, Alexia, Dominique, Muriel, Laurence et Laetitia, pour votre patience et votre aide au quotidien. **Alexia** j'attends toujours ta version des cake pops... Et **Muriel** merci pour tous tes mots gentils chaque matin, ils me donnent le courage d'affronter la journée !

Les **techniciennes**, qui m'ont tout appris... Un énorme merci pour votre patience, vos conseils et surtout de me supporter chaque jour ! Merci de croire en moi et, malgré les difficultés, j'espère travailler encore longtemps à vos côtés.

Michèle pour ta douceur et ta gentillesse, **Irène** pour ton rire et ta sympathie, **Val** et **Annie** (alias Chef !) les sportives de chaque jour, merci pour vos boules qui chamboulent, ça motive ! **Thi-Phong** pour tes conseils et ton beau sourire, **Nath** pour ta sympathie et tes conseils, **Marie-Jo** pour tes sourires chaque matin et pour tes recherches de restos pour mon pot ! **Anne** pour nous faire rêver de voyages tous les jours et **Rachel** pour le vent de fraîcheur que tu nous as apporté !

FloFlo même si tu nous as abandonnées, je ne t'oublie pas ! Merci pour tous tes conseils et surtout pour ton rire communicatif, je l'entends encore résonner dans le labo... !

Et ma **Cathy**, tu sais à quel point je t'apprécie... merci de transmettre ton savoir à toutes les personnes qui passent dans ce labo, dont tu es un solide pilier. Merci de m'avoir formée, avec bienveillance et gentillesse ! Tu as un cœur en or, n'oublie pas d'en prendre soin...

Mes co-internes, d'hier ou d'aujourd'hui : **Sarah-Lili** pour nos footings matinaux sur le Prado... où la température était un peu plus fraîche qu'en Martinique, je comprends pourquoi tu t'es enfuie ! **Omar** pour ta gentillesse et ton sourire ravageur ! **Lina** et **Nadia**, mes livreuses de déjeuner attitrées, sans qui j'aurais sûrement beaucoup trop maigri... un grand merci !

Enfin, l'équipe clinique : merci aux **gynécologues, sages-femmes, infirmières et internes** pour tout ce que vous m'avez appris. Un petit mot spécial pour **Dahbia** et **Maëlle**, mes rayons de soleil !

Une pensée particulière :

A l'équipe du laboratoire **Antoine Béclère** : **Anne, Laeti, Vincent, Alex, Stéphane, Ilan, Claire, Mylène, Alex, Dominique, Benito, Blan, Cathie, Cricri, Juju, Soso et Val...**

A défaut de vous avoir à mes côtés ce soir, je vous ai déjà tout dit il y a quelques mois (mais cette fois devant mon ordi, je ne tremble pas... !) Je résumerai donc tout ce que je ressens en un énorme : merci pour tout ! Jamais je n'aurais imaginé passer 6 mois d'une telle qualité... Encore merci à **Nelly**, sans qui cela n'aurait pas été possible.

A ma co-interne de l'amour, mon binôme de chaque jour, **ma Juju** !

Je garde ma trop grande déclaration sur un petit papier, mais sache que tu fais partie de mes plus belles rencontres... De notre 1^{ère} soirée à crouler sous les dossiers, à la dernière autour d'un Canadagasm... Merci d'avoir été là ! Tik & Tek les inséparables ! A très vite pour notre projet commun ma Muzzetta ! (Oups désolée des Corses vont lire ça... !)

Je remercie également :

Tous les membres des laboratoires de biochimie, de bactériologie-virologie, d'hématologie et d'immunologie de l'AP-HM. Je remercie les techniciens et biologistes de ces services pour leur enseignement attentif et leur disponibilité au cours de mon internat.

Je ne vous oublie pas, non, jamais... 

Ma famille, avant tout...

Mes Mamies chéries, j'espère que depuis les étoiles vous êtes fières de moi, j'aurais tellement aimé vous serrer dans mes bras ce soir... Vous me manquez terriblement.

Ma Sister **L'ti**, ma conseillère bancaire, mais surtout ma conseillère de Vie, merci de me montrer le bon chemin et d'être toujours là pour moi, quoiqu'il arrive...! Promis je me penche sur ma liste dès demain (ou dimanche... !) Merci pour tous les souvenirs gravés grâce à toi... A quand un nouveau road trip ? « *If you see somesssing... !* »

Mam's merci pour nos discussions plus apaisées et remplies de bonnes idées. Après ces 13 années de stress, il est grand temps de décompresser... Place maintenant à des projets plus légers mais tout aussi gratifiants : voyages, appart' et ShakeShack, ça sera pas mal pour commencer !

J'espère que tu es fière de moi Mam's, malgré le délai...! « *A la folie... ? Plus que ma vie !* »

Pap', merci pour ton soutien et tes conseils... Malgré les embûches, j'espère que tu es fier du chemin parcouru... Et sache que ta guitare est toujours dans sa housse depuis la P2, il est temps que tu m'apprennes à y jouer ! On a du temps à rattrapper...

Mon filleul **Baptiste**, j'espère réussir à te guider vers tes rêves les plus grands.

Tata **Annie** et Tonton **Henri**, merci pour tous ces bons repas partagés à vos côtés, à Vivario ou à Giraud !

Mes **oncles** et **tantes**, **cousins** et **cousines**, malgré la distance, je pense à vous.

Mes amies, toujours présentes depuis ma plus tendre enfance :

Coco, ma Frouiit et ma Juju : notre quatuor de danseuses étoiles a fait des ravages pendant plus de 15ans ! (Enfin, un peu moins pour certaines...!)

Coco, merci d'être là ce soir, ça me touche énormément ! Je ne dirais qu'une chose : « *Corsica Sera Bona Sera, Corse Soir Bonsoir !* »

Mattea et tes Snap plus fous les uns que les autres ! Sache que je suis triste que tu ne m'aises pas maquillée pour l'occasion, tu aurais pu faire un effort tabernacle !

Juju pour nos discussions enflammées sur la Vie... (et nos familles... !)

Les **Canarelli**, merci de m'avoir accueillie dans le grand nord et pour toutes nos discussions plus animées les unes que les autres !

Mes amies, rencontrées quelques années après, mais toujours fidèles au poste :

Ma **Bibi Fanée**, alias Papao, à nos souvenirs en rentrant de Via Notte « *Ne te retourne pas !* » « *On est à Luuumio !* » et désormais pour me montrer la vraie vie de Maman... Vive les manèges et les châteaux gonflables !

Ma Fillette d'amour, une rencontre pas comme les autres et une amitié sans faille depuis les bancs de la fac à Corté. Tu es une femme pleine de ressources et je t'admire pour ça... Un nouveau chapitre s'offre à toi, Ta Reum est ravie que tu en deviennes une, promis je serai plus souvent présente dès ce soir !

Mes ajacciennes chéries **Annabyou** et **Stefyou**, que pourrais-je dire que vous ne sauriez pas déjà... ? Merci aux multiples P1 qui m'ont permis de croiser votre chemin, et de créer des liens si forts qu'ils ne se briseront jamais ! Merci pour toutes ces années pharmas, pour votre présence et tous nos souvenirs : les soirées Sushis & Glam, nos déguisements pour Halloween, nos soirées au « HushHush » et nos séances de bronzage... Vous me manquez beaucoup par ici, qui sait peut-être qu'un jour je deviendrai votre voisine moi aussi... !

Merci à **Jean-Louis** et **Marc-Ange** de prendre soin de vous !

Et **Annab** à notre coloc, à tous les bons repas que tu m'as mijotés... et nos réveils à 5h45 pour les éliminer ! Je n'aurais jamais pensé ne pas t'avoir à mes côtés en ce jour si spécial... mais j'en dirai 2 mots à Raphou dans quelques années ! ;)

Mes Jeunes Pousses bastiaises :

Toinou, Seb, Jack, Benji, PAM, Alban, Alex et Pasqua, à tous nos étés passés en compagnie d'apéricubes ou de planteurs citron et à nos 31 toujours plus réussis les uns que les autres... !

Mes ami(e)s pharmas, et les jolies rencontres annexes :

Ma **Titi d'amour**, merci pour toutes ces années passées à tes côtés, sur le trajet de la fac ou sur le banc de l'amphi, à refaire le monde au lieu d'écouter les profs... « *Tu m'étoooonnes qu'il était long le film !* » Il est grand temps que je rencontre enfin le fruit de votre amour !

Sans oublier nos soirées « Un dîner plus que parfait » avec **Coco, Emma et Sophie** !

Ma **Sifia**, partenaire de choc en cours, mais surtout à la BU pendant ces 2 années d'horreur ! Merci pour ton soutien et nos discussions remplies d'espoir dans le patio ! 4 ans après nous voilà enfin dans cette fameuse salle de thèse... Courage, tu y es presque toi aussi !

Claire, Jess, Laurie, Laeti et Harold, merci pour tous ces bons moments passés ensemble, toujours dans la bonne humeur et le sourire aux lèvres, restez comme vous êtes !

(**Claire**, à l'heure où j'écris ces lignes, je me rends compte que je ne suis pas venue te voir pour le β-b... Verdict ce soir !)

Nathan, Antoine et Didier les béèos de l'équipe ! Vous me manquez ce soir, mais c'est pour la bonne cause : Didi courage à toi aussi, on est bientôt libres !!!

Pour ceux qui s'en rappellent, je n'ai qu'une chose à dire : « Tu peux t'brosser Nadine ! »

Ma **Coco adorée** et **Marie ma belle des îles**, avec qui j'ai traversé une rude année au CCM, merci d'avoir été là ! Et quelques années après, je suis ravie d'avoir partagé ces si beaux moments avec vous le mois dernier... en espérant qu'il y en ait un autre bientôt... !!

Ma **Laloute d'amour**, encore une belle rencontre grâce à un concours... Un parcours identique et une amitié trouvée... Tu sais déjà tout, mais encore merci d'être toujours là quand il le faut et merci de me faire partager les plus beaux moments de ta vie et les plus importants... J'espère être à la hauteur de ta confiance ! Hâte qu'on se crée encore de nombreux souvenirs ensemble !

Mes **rencontres d'internat**, une belle équipe qui s'est formée, merci pour tous les beaux moments que l'on a partagés :

Tarek ou la force tranquille mon 1^{er} co-interne que je n'oublierai pas, **Bassam Fatih** et **Momo**, le trio de chic et de choc, **Jean-Sé** l'original : trompettiste et capitaine de soirée, **Titi** et **JuJu** le duo de grimpeurs, **Léa** le moteur du groupe, **Estelle** la fashion victim nouvelle aventurière, **Clem** notre maman à tous, **Guigui** le militaire microbiologiste, **Baptiste** le futur petit Suisse goût Pastis, **Maxence** l'ambianceur des soirées, **Damien** le chercheur qui n'a toujours pas trouvé l'heure, **Alex** dont la gentillesse n'a égale que sa taille, **Thomas** le surfeur toujours bronzé, **Maxime A** et **Steph** le couple parfait, **Steph** et **Pierro** les futurs lyonnais, **Tinou** et **Sarah** le couple de mannequins, **Loris** et **Amandine** les chercheurs amoureux, **Nico** ou l'homme qui grandit chaque jour un peu plus, **PRP** mon externe préféré et **Maxime L** notre assistant adoré.

Ma **Chacha**, ma super co-interne d'un semestre qui n'était pas de tout repos... ! Merci pour ton soutien et toutes nos discussions ! Et de me faire rêver avec tous tes voyages...

Mes blondies chères, **Popo** et **Cloclo**, notre amitié aurait pu commencer quelques années plus tôt mais c'est l'internat qui nous a rapprochées... Des souvenirs gravés, un beau voyage partagé et j'espère en vivre encore pleins d'autres à vos côtés ! Merci pour votre soutien sans faille et vos conseils toujours justes et remplis d'amour... Je n'aurais qu'un mot à dire pour résumer notre amitié : « *Tankiouuu* » !

Et enfin **Jordan**, merci pour ton soutien, ta patience et ton calme olympique...

Merci de me rassurer chaque jour et de me tirer vers le haut lorsque le doute s'installe...

Mais surtout merci de me supporter... moi et mon super caractère ! Promis, maintenant que la thèse est passée, je ferai tous les efforts du monde pour être moins stressée... et te faire à manger !

Que ce tournant nous apporte pleins de belles surprises et de nouveaux défis à relever !

A tous ceux que j'aurais pu oublier, veuillez me pardonner...

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	9
TABLE DES MATIERES	15
LISTE DES ABREVIATIONS	17
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	18
PARTIE I : INTRODUCTION	19
A. CULTURE EMBRYONNAIRE PRECOCE	20
1. <i>Définition et indications</i>	20
2. <i>Avantages</i>	20
3. <i>Inconvénients</i>	21
B. CULTURE EMBRYONNAIRE PROLONGEE	21
1. <i>Définition et indications</i>	21
2. <i>Avantages</i>	22
3. <i>Inconvénients</i>	23
C. NOMBRE D'EMBRYON(S) A TRANSFERER	24
1. <i>Single Embryo Transfer (SET)</i>	24
2. <i>Double Embryo Transfer (DET)</i>	24
3. <i>Triple Embryo Transfer (TET)</i>	25
PARTIE II : OBJECTIFS DE L'ETUDE	26
PARTIE III : MATERIELS ET METHODES	27
A. DESCRIPTION DE L'ETUDE	27
1. <i>Recueil de données</i>	27
2. <i>Critères d'inclusion</i>	27
3. <i>Critères d'exclusion</i>	27
4. <i>Schéma récapitulatif de l'étude (Flow Chart)</i>	29
B. DEROULEMENT D'UNE TENTATIVE DE FIV	30
1. <i>Stimulation ovarienne</i>	30
2. <i>Ponction et recueil folliculaire</i>	30
3. <i>Préparation de sperme</i>	31
4. <i>Mise en fécondation</i>	31
5. <i>Culture embryonnaire</i>	32
6. <i>Transfert embryonnaire et issue de grossesse</i>	37
C. CRITERES EVALUES	38
1. <i>Valeur Prédictive Positive</i>	38
2. <i>Valeur Prédictive Négative</i>	38
3. <i>Sensibilité</i>	38
4. <i>Spécificité</i>	38
5. <i>Taux de Grossesse clinique / Transfert</i>	38
6. <i>Taux de Grossesse Gémellaire / Grossesse</i>	39
7. <i>Taux de Fausse Couche Spontanée (FCS) / Grossesse</i>	39
8. <i>Taux de Grossesse Extra-Utérine (GEU) / Grossesse</i>	39
9. <i>Taux d'Interruption Médicale de Grossesse (IMG) / Grossesse</i>	39
10. <i>Taux d'accouchement / Transfert</i>	40
D. ANALYSE STATISTIQUE	40

PARTIE IV : RESULTATS	41
A. EMBRYONS « TOP »	41
1. <i>Résultats globaux</i>	41
2. <i>Embryons « Top » en fonction de l'âge des patientes</i>	43
3. <i>Embryons Top en fonction du rang de tentative</i>	45
4. <i>Résultats en fonction du transfert sélectif ou non d'un embryon</i>	46
B. EMBRYONS « NON TOP »	47
1. <i>Résultats globaux</i>	47
2. <i>Embryons « Non Top » en fonction de l'âge des patientes</i>	49
3. <i>Embryons « Non Top » en fonction du rang de tentative</i>	50
C. CAS PARTICULIER DES TET	51
D. COMPARAISON DES TAUX DE FCS	51
E. PERFORMANCES DU TEST	52
PARTIE V : DISCUSSION	53
A. PRINCIPAUX RESULTATS	53
B. LIMITES DE L'ETUDE	55
C. UTILITE DE L'ETUDE	58
PARTIE VI : CONCLUSION	59
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	61

LISTE DES ABREVIATIONS

ABM	Agence de la Bio Médecine
AMP	Assistance Médicale à la Procréation
CCO	Complexe Cumulo-Ovocytaire
DET	Double Embryo Transfer
DO	Don d’Ovocytes
DPI	Diagnostic génétique Pré-Implantatoire
eSET	Elective Single Embryo Transfer
FCS	Fausse Couche Spontanée
FIV	Fécondation In Vitro
FIVc	Fécondation In Vitro classique
GEU	Grossesse Extra-Utérine
GP	Globules Polaires
βhCG	human Chorionic Gonadotropin
HSO	Hyper Stimulation Ovariennne
ICSI	Intra Cytoplasmic Sperm Injection
IMG	Interruption Médicale de Grossesse
J2, J3, J5	2 ^{ème} , 3 ^{ème} , 5 ^{ème} Jour de développement embryonnaire
MIV	Maturation In Vitro
PF	Préservation de Fertilité
PN	ProNucléi
SA	Semaine d’Aménorrhée
SET	Single Embryo Transfer
TEC	Transfert d’Embryon Congelé
TEF	Transfert d’Embryon Frais
TET	Triple Embryo Transfer
VPN	Valeur Prédictive Négative
VPP	Valeur Prédictive Positive

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Ovocyte fécondé observé 20 heures après insémination (stade zygote) _____	32
Figure 2 : Observation à la 27ème heure après insémination. _____	33
Figure 3 : Exemple de typage d'embryons selon leur morphologie observée à J2. _____	35
Figure 4 : Observation embryonnaire de l'évolution d'un blastocyste. _____	36
Figure 5 : Typage d'embryons selon leurs critères morphologiques. _____	36
Tableau 1 : Classification des embryons selon leurs critères morphologiques au stade clivé (J2/J3) _____	34
Tableau 2 : Classification des embryons selon leurs critères morphologiques au stade de blastocyste (J5) _____	36
Tableau 3 : Résultats Embryons « Top » _____	41
Tableau 4 : Résultats Embryons « Top » en fonction de l'âge des patientes _____	43
Tableau 5 : Résultats Embryons « Top » en fonction du rang de tentative _____	45
Tableau 6 : Résultats en eSET ou non eSET _____	46
Tableau 7 : Résultats Embryons « Non Top » _____	47
Tableau 8 : Résultats Embryons « Non Top » en fonction de l'âge des patientes _____	49
Tableau 9 : Résultats Embryons « Non Top » en fonction du rang de tentative _____	50
Tableau 10 : Taux de FCS en fonction de la morphologie embryonnaire et du stade de développement _____	51
Tableau 11 : Performances du test : Sensibilité et Spécificité _____	52

PARTIE I : INTRODUCTION

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit l'infertilité par l'absence de grossesse après plus de 12 mois de rapports sexuels réguliers, sans contraception (*OMS 2010*).

En France, un couple sur 5 est amené à consulter pour infertilité au cours de sa vie. Trente pourcent des cas d'infertilité sont d'origine masculine, 30% d'origine féminine, 20% d'origine mixte. Enfin, 20% des infertilités restent inexpliquées après exploration clinique et paraclinique. Même si cela ne constitue pas un risque vital en soi pour les patients, l'infertilité est très souvent source de souffrance psychique et de difficultés socio-professionnelles pour les couples.

Depuis la naissance en 1978 du premier « bébé éprouvette », Louise Brown, obtenue par Fécondation In Vitro (FIV) des millions d'enfants ont été conçus par AMP. En France, en 2015, l'AMP a permis de donner naissance à 24839 enfants, soit 3% des naissances de cette même année. Cela représente en FIV et en ICSI (Injection Intra-Cytoplasmique de Spermatozoïde), un taux de grossesse et d'accouchement par transfert d'environ 25% et 20% respectivement (*bilan ABM 2015*).

L'un des défis des médecins, biologistes et scientifiques depuis 40 ans est d'améliorer les conditions, les techniques et les pratiques de fécondation in vitro afin d'optimiser les chances d'implantation embryonnaire.

La politique du nombre d'embryons à transférer a ainsi évolué avec une augmentation progressive du nombre de transferts mono-embryonnaires après FIV ou ICSI. Celui-ci est passé de 31% en 2011 à 42% en 2015 (*bilan ABM 2015*). Cette tendance à la hausse est le reflet d'une politique de transfert embryonnaire plus prudente, visant à réduire le nombre de grossesses multiples et prévenir ainsi leurs complications maternelles et fœtales (*Boyer et al. 1990 ; Pandian et al. 2013*).

Initialement, le transfert se déroulait exclusivement au stade clivé (2ème ou 3ème jour du développement embryonnaire) quel que soit le nombre d'embryon(s) à transférer. Les chances de grossesse ont été démontrées comme étant équivalentes entre J2 et J3 (*Laverge et al. 2001 ; Brown Cochrane 2016 ; Lee et al. 2017*). L'amélioration des conditions de culture a permis par la suite de proposer la culture embryonnaire jusqu'au 5ème jour de développement (stade blastocyste) afin de mieux apprécier le potentiel évolutif de l'embryon et ainsi d'améliorer le choix de l'embryon à transférer (*Braude et al. 1988*). Le transfert au stade blastocyste permettrait de meilleurs taux d'implantation comparé au stade clivé (*Gardner et al. 1998*). De nombreuses études ont été menées afin de comparer ces deux stratégies (*Papanikolaou et al. 2006 ; Zech et al. 2007 ; Maheshwari et al. 2016*) et les politiques de transfert restent très variables selon les centres d'AMP.

A. CULTURE EMBRYONNAIRE PRECOCE

1. Définition et indications

La culture embryonnaire précoce correspond au développement embryonnaire in vitro jusqu'au 2^{ème} ou 3^{ème} jour (J2/J3 ou stade clivé) après la mise en fécondation.

Initialement, cette technique a longtemps été la plus utilisée dans les centres d'AMP. L'évaluation de la morphologie embryonnaire permet de décrire finement certains critères de l'embryon et aboutit à l'apposition d'un grade ou score pour chaque embryon observé. Ainsi, le potentiel implantatoire de l'embryon est évalué indirectement par l'utilisation de ce type de classification.

Plusieurs auteurs ont décrit l'importance de certains paramètres dans la survenue de l'implantation (*Van Royen et al. 1999 ; Hardarson et al. 2001 ; Rienzi 2005 ; Fauque et al 2007, Prados et al. 2012*), mais depuis quelques années, un Consensus à l'échelle européenne a été retenu (*Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011*).

Les critères retenus sont :

- le nombre de blastomères,
- la taille des blastomères qui doit correspondre au stade de développement,
- la proportion de fragments intra-pellucidaires,
- la présence de blastomères multinucléés.

La culture précoce est indiquée dans les cas suivants :

- 1^{ères} tentatives de FIV le plus souvent,
- faible cohorte ovocytaire à la ponction,
- échecs de transferts répétés au stade de blastocyste, ou absence d'obtention de blastocyste lors des tentatives précédentes.

2. Avantages

Elle permet un temps d'exposition réduit de l'embryon aux conditions de culture in vitro, diminuant ainsi les éventuels risques inutiles dus aux réactifs utilisés.

A ce stade, le nombre d'embryons transférables est plus important, le risque de non-transfert est ainsi diminué. Les embryons de bas grade qui n'auraient peut-être pas résisté à une culture in vitro peuvent être transférés à J2/J3 et pourraient donner des grossesses (*Maheshwari et al. 2016*).

L'arrêt de culture au stade clivé permet de congeler un plus grand nombre d'embryons et ainsi d'effectuer plus de Transferts d'Embryons Congelés (TEC). Les taux cumulés de grossesse à J3 (TEF + TEC) rattrapent en général les taux en TEF (Transferts d'Embryons Frais) à J5 (*Pandian et al. 2013*).

3. Inconvénients

Une morphologie typique au stade clivé est moins discriminante des aneuploïdies comparativement au stade de blastocyste (*Fragouli et al. 2014*).

A ce stade, la stratégie adoptée est le plus souvent le transfert de 2 embryons (DET) pour augmenter les chances de grossesse, mais cela implique une augmentation du taux de grossesse gémellaire.

Enfin, le transfert d'embryon au stade clivé n'est pas physiologique en terme de synchronicité avec la muqueuse utérine, car physiologiquement à J2/J3 l'embryon se trouve dans la trompe, ce qui pourrait diminuer les chances d'implantation.

B. CULTURE EMBRYONNAIRE PROLONGEE

1. Définition et indications

La culture embryonnaire prolongée correspond au développement embryonnaire *in vitro* jusqu'au 5^{ème} ou 6^{ème} jour (J5/J6 ou stade blastocyste) après la mise en fécondation.

A ce stade, le potentiel implantatoire des embryons est apprécié grâce à plusieurs critères morphologiques (*Gardner et Schoolcraft 1999, Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011 ; Hardarson et al. 2012*).

La classification de Gardner et Schoolcraft est basée sur :

- le degré d'expansion de la cavité blastocœlique,
- la morphologie du bouton embryonnaire, à l'origine du fœtus,
- le nombre et l'aspect des cellules formant le trophoblaste, à l'origine du placenta.

La culture prolongée peut être indiquée dans les cas suivants :

- grandes cohortes ovocytaires à la ponction, associées à un développement embryonnaire précoce satisfaisant,
- embryons surnuméraires après transfert au stade clivé,
- échecs de transferts répétés au stade clivé,
- syndrome d'HyperStimulation Ovariennes (HSO) avec freeze-all (congélation totale pour transfert différé).

2. Avantages

La culture prolongée permet une sélection embryonnaire naturelle.

Lorsqu'une anomalie de qualité ovocytaire est suspectée, la culture prolongée permet d'évaluer l'aptitude des zygotes à se développer après activation du génome embryonnaire à J3 (*Braude et al. 1988*). Cela permet une sélection cytogénétique des embryons (la moitié des embryons bloqués *in vitro* sont porteurs d'aneuploïdies incompatibles avec une implantation). Ainsi, il est possible d'écartier du transfert les embryons qui auraient un retard ou blocage de développement après J3 (*Boyer et al. 2011*).

L'évolution vers la culture prolongée est croissante, du fait de la tendance au transfert d'un seul embryon et la volonté de diminuer les grossesses gémellaires et les risques de morbi-mortalité fœto-maternels associés, sans perdre de chances de grossesse. (*Gardner et al. 1998* ; *Papanikolaou et al. 2006* ; *Zech et al. 2007* ; *Guerif et al. 2009*)

D'autre part, l'implantation embryonnaire serait plus efficace grâce à une meilleure synchronisation avec l'endomètre, car le blastocyste est naturellement à ce stade dans l'utérus, et les taux élevés d'œstrogènes après stimulation auraient un effet néfaste sur l'embryon. Un transfert à J5 pourrait donc réduire le temps d'exposition et aurait un effet bénéfique sur le taux d'implantation (*Check et al. 1995* ; *Valbuena et al. 2001* ; *Kolibianakis et al. 2002*).

Il a également été démontré qu'une fréquence élevée de contractions utérines au moment du transfert embryonnaire serait associée à une réduction des taux d'implantation et de grossesse clinique. L'une des hypothèses serait l'expulsion possible de l'embryon au moment du transfert. Ces contractions diminueraient dans les quelques jours suivant l'injection de l'hCG (*De Ziegler et al. 2001* ; *Fanchin et al. 2001*).

Enfin, lorsque certains embryons ne répondent pas aux critères d'évaluation morphologique nécessaires pour être congelés à J2/J3 (retard important de clivage, fragmentation cellulaire importante), ils peuvent être congelés ultérieurement en étant cultivés jusqu'au stade de blastocyste. En effet, il n'est pas possible d'exclure un potentiel d'évolution au stade de blastocyste avec les critères morphologiques actuels (*Poulain et al. 2014*). Cela va également dans le sens des recommandations de la loi de Bioéthique de juillet 2011, visant à diminuer le nombre d'embryons conservés.

3. Inconvénients

Il est également important de garder à l'esprit que l'environnement dans le laboratoire, tel que les milieux de culture, le pH et la température, influence la cinétique du développement (*Sermondade et al 2012 ; Gardner et al. 2016*). La qualité de la culture prolongée est dépendante du niveau d'équipement du laboratoire d'AMP en incubateurs optimisés et coûteux.

Le taux de blastulation totale (obtention de blastocystes à partir d'embryons clivés) n'est que d'environ 50% (*Staessen et al. 2004 ; Bilan ABM 2015*) et la blastulation utile (blastocyste de bonne qualité) n'est que de 30%.

Celle-ci est influencée par la composition de l'atmosphère, notamment l'hypoxie, qui est optimale grâce aux incubateurs trigaz (*Meintjes et al. 2009*), ainsi que par la culture en chambre individuelle, permettant d'éviter les variations fréquentes des conditions de culture.

De ce fait, le risque de non-transfert pour arrêt de développement ou morphologie insuffisante est significativement plus élevé à J5, cela implique pour certaines patientes d'avoir subi un traitement hormonal et chirurgical, sans que celui-ci n'aboutisse à l'étape ultime du transfert, ce qui est mal vécu par les couples et peut à terme conduire à l'abandon du projet d'AMP (*NICE Clin Guide 2013*).

D'autre part, d'après certaines études, la culture prolongée pourrait augmenter les poids de naissance (macrosomie), le déséquilibre du sex-ratio homme-femme, les taux de jumeaux monozygotes et d'accouchements prématurés (<37 SA et <32 SA) (*Milki 2003 ; Chang et al. 2009 ; Wang et al. 2017*).

C. NOMBRE D'EMBRYON(S) A TRANSFERER

1. Single Embryo Transfer (SET)

Le transfert d'un seul embryon peut être proposé ou imposé au couple.

En effet, s'il existe une contre-indication médicale à une grossesse gémellaire, pour malformation utérine, béance cervicale ou syndrome de Turner par exemple, un seul embryon sera choisi pour le transfert.

La décision de ne transférer qu'un seul embryon peut se faire également dans les cas suivants :

- lors de la prise en charge d'un couple jeune et/ou d'une 1^{ère} ou 2^{ème} tentative de FIV,
- lors d'un « eSET », ou transfert électif : si dans la cohorte se trouvent plusieurs embryons transférables de bonne morphologie (embryon dit « Top »), un seul sera choisi avec la possibilité de congeler les embryons restants en vue d'un transfert différé,
- lorsqu'il s'agit du choix du couple, s'il souhaite ne pas prendre le risque d'une grossesse gémellaire.

Cependant la réalisation d'un SET entraîne une diminution du taux de grossesse clinique par rapport au DET, mais cette différence disparaît lorsqu'on considère le taux cumulé de grossesse (en TEF + TEC). D'après la méta-analyse de Pandian et al. en 2013, un transfert de 2 embryons offrait 42% de chances de naissances vivantes, contre 37% suite à un transfert répété d'un seul embryon. De plus, le taux de grossesse gémellaire est significativement réduit grâce à cette stratégie (13% versus 0-2%), ce qui est l'objectif à atteindre par les équipes médicales en AMP (*Pandian et al. 2013*).

En 2004, Lukassen et al. ont également montré que chez les femmes de moins de 35ans, qui avaient au moins un embryon « Top » pour leur 1^{ère} tentative de FIV, le taux cumulé de naissance était de 41% après 2 cycles consécutifs avec SET sans aucune grossesse multiple, versus 36% lors d'un cycle avec DET, dont 1/3 étaient multiples.

2. Double Embryo Transfer (DET)

Le transfert de 2 embryons peut être proposé dans les cas suivants :

- lors d'une tentative de mauvais pronostic : mauvaise qualité ovocytaire, morphologie embryonnaire de bas grade (embryon dit « Non Top »), taux de fécondation diminué...
- lors d'échecs d'implantation pour les tentatives précédentes en SET ou en DET,
- lorsqu'il s'agit de la dernière tentative pour le couple,
- enfin, si le couple choisit de prendre le risque d'une grossesse gémellaire.

Depuis le début de la FIV, le transfert de 2 embryons était la stratégie la plus fréquemment utilisée afin d'offrir les meilleures chances de succès aux patients.

Réaliser un transfert de 2 embryons permet d'augmenter les chances de grossesses et de naissances vivantes (45% versus 28% en SET, d'après la méta-analyse de Pandian et al. en 2013). Cependant cette stratégie tend à diminuer au profit du transfert mono-embryonnaire, afin de réduire significativement les risques dus à une grossesse multiple (14% en DET versus 2% en SET). En effet en 2009, le taux de DET réalisés en France était de 59% versus 32% de SET alors qu'en 2015, il y a eu 52% de DET et 42% de SET (*Bilan ABM 2015*).

3. Triple Embryo Transfer (TET)

En France, la loi autorise le transfert de 1, 2 ou 3 embryons.

Cependant, du fait de l'évolution vers le SET et la prévention de la survenue de grossesses multiples, le transfert de 3 embryons reste assez rare et doit être justifié dans le dossier médical du couple.

Il est indiqué dans les cas de dernières tentatives et/ou lorsque les patientes atteignent un âge plus avancé voire limite (proche des 42 ans) et lorsque les embryons ne présentent pas une morphologie de haut grade le plus souvent, car ce sont des situations offrant des chances de succès nettement réduites.

PARTIE II : OBJECTIFS DE L'ETUDE

Dans l'objectif de validation de la méthode d'observation embryonnaire et de la classification apposée sur chaque embryon au stade précoce et tardif, une étude préliminaire a été menée au laboratoire de l'hôpital Antoine Béclère, entre Janvier 2011 et Juillet 2013 (Audit COFRAC en Novembre 2013). Le but était de définir la Valeur Prédictive Positive (VPP) et Négative (VPN) de la méthode utilisée, sur la survenue d'une implantation, pour les SET et les DET.

Lors d'un transfert d'un seul embryon « Top », la VPP était de 29% au stade clivé et 60% au stade de blastocyste. Alors que lorsqu'il s'agissait d'un transfert de 2 embryons « Top », les VPP étaient identiques à 40%, quel que soit le stade de développement embryonnaire. De nombreux embryons évalués comme « Top » ne se sont pas implantés, limitant ainsi la spécificité du test.

La VPN du SET concernant les embryons « Non Top » était de 89% au stade clivé et de 71% au stade de blastocyste ; et lors d'un DET, les VPN étaient de 77% et 74% respectivement. Certains embryons « Non Top » ont donc un potentiel implantatoire et peuvent être considérés comme des faux négatifs, abaissant la sensibilité du test.

Le phénomène implantatoire étant multi factoriel, nous avons décidé d'étendre l'étude afin d'augmenter le nombre d'embryons analysés et de compléter nos résultats par des données cliniques qui étaient manquantes. De plus, le centre présentant un taux de grossesse gémellaire de l'ordre de 25%, nous souhaitions donc établir les réelles chances de succès lors du transfert d'embryons « Top » ou « Non Top » selon leur stade de développement, afin d'adapter la stratégie de transfert embryonnaire au laboratoire. La demande actuelle des cliniciens est d'étendre systématiquement la culture embryonnaire jusqu'au stade de blastocyste. Cette étude devrait donc nous permettre d'optimiser la discussion clinico-biologique au moment de l'inclusion des couples en AMP, ainsi que l'information donnée aux couples en consultation.

Nous avons analysé les transferts d'embryons frais entre Janvier 2014 et Décembre 2016, en tenant compte de leur stade de développement et de leur morphologie, ainsi que de l'âge des patientes et du rang des tentatives.

Si nos premiers résultats se confirmaient, avec un avantage du stade blastocyste en SET et une équivalence entre stade clivé et blastocyste en cas de DET, nous pourrions adapter les pratiques du laboratoire :

- ne réaliser que des transferts au stade de blastocyste en cas de programmation d'un SET,
- éviter d'effectuer une culture prolongée lorsqu'un DET est programmé, puisque celle-ci entraîne une augmentation inutile du temps d'exposition des embryons à une culture in vitro.

PARTIE III : MATERIELS ET METHODES

A. DESCRIPTION DE L'ETUDE

Il s'agit d'une étude rétrospective mono-centrique, menée au sein de l'unité de Biologie de la Reproduction de l'hôpital Antoine Béclère à Clamart (AP-HP), entre le 1^{er} Janvier 2014 et le 31 Décembre 2016. L'analyse a concerné 1316 transferts, correspondants à 1039 couples.

1. Recueil de données

Le recueil de données a été réalisé grâce à une extraction informatique à partir du logiciel Médifirst®. L'âge de la patiente, le rang de la tentative, la date de ponction / transfert, le nombre d'embryons transférés, la morphologie embryonnaire, le dosage des β hCG post-transfert, le nombre d'embryons implantés (échographie) et les issues de grossesses, ont été déterminés grâce au fichier issu de l'extraction.

2. Critères d'inclusion

Ont été inclus dans l'étude les couples ayant bénéficié :

- d'un transfert d'embryon(s) frais (TEF) issus de FIV avec ou sans ICSI, avec sperme du conjoint (éjaculé frais, congelé éjaculé ou testiculaire) ou d'un donneur.
- soit dans le cas d'un Single Embryo Transfer (SET) dont l'embryon était évalué « Top » ou « Non Top » au stade clivé (J2 ou J3) ou blastocyste (J5),
- soit d'un transfert de 2 embryons, Double Embryo Transfer (DET), de morphologie homogène « Top » ou « Non Top », au stade clivé (J2 ou J3) ou blastocyste (J5),
- soit d'un transfert de 3 embryons, Triple Embryo Transfer (TET), de morphologie homogène « Top » ou « Non Top », au stade clivé (J2 ou J3) ou blastocyste (J5).

3. Critères d'exclusion

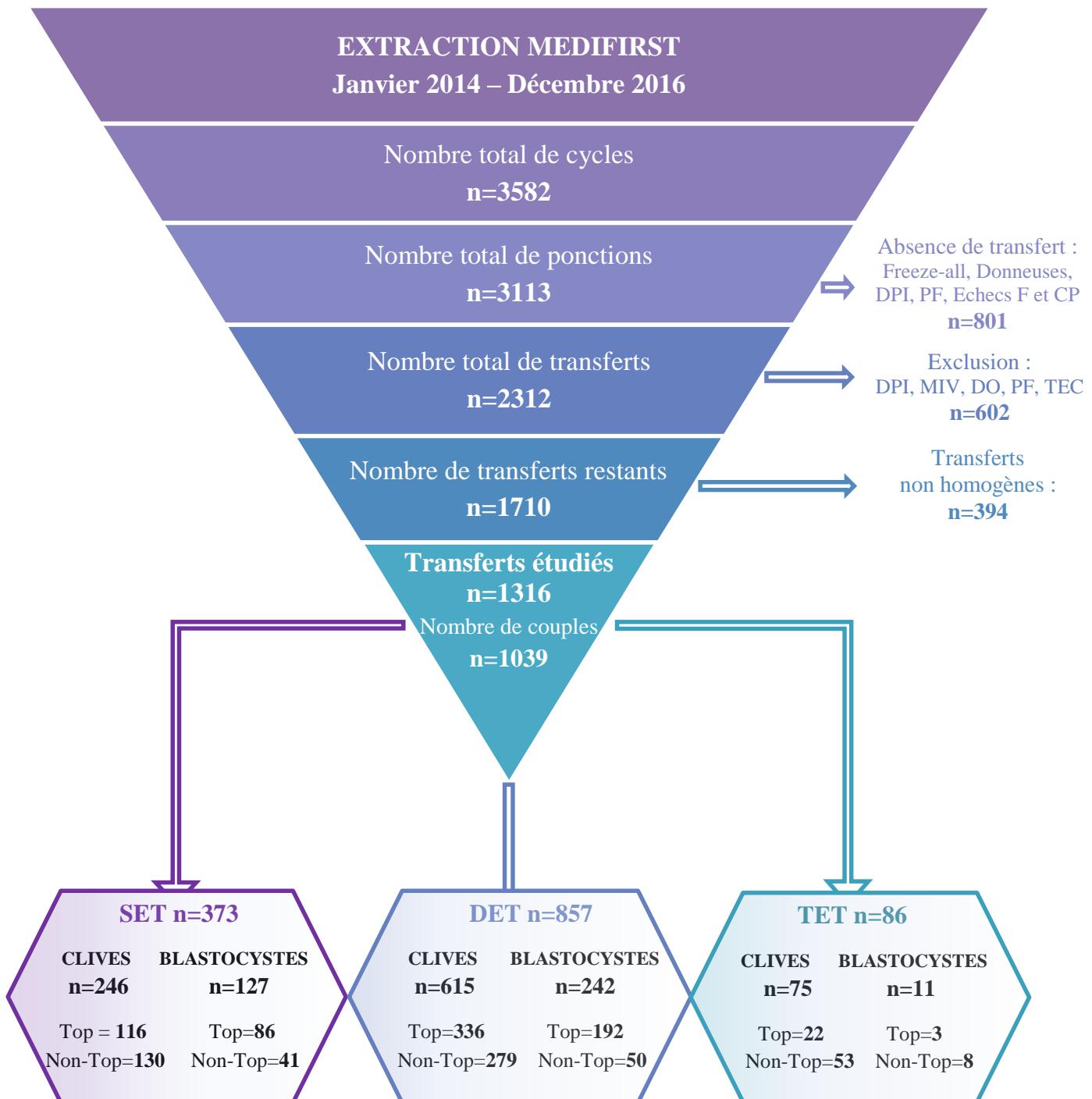
Ont été exclus de l'étude 602 transferts, comprenant :

- les transferts d'embryons congelés (TEC),
- les transferts issus de tentatives réalisées dans un contexte de préservation de fertilité (PF),

- les transferts issus de tentatives réalisées dans un contexte de Diagnostic génétique Pré-Implantatoire (DPI),
- les transferts issus de tentatives réalisées dans un contexte de Maturation Ovocytaire in Vitro (MIV),
- les transferts issus de tentatives réalisées dans un contexte de Don d’Ovocytes (DO),
- les transferts non homogènes (n=394) : DET ou TET avec un embryon « Top » et un embryon « Non Top », afin de pouvoir associer la morphologie embryonnaire aux résultats d’implantation.

3582 cycles de stimulation ovarienne ont été débutés, certains ont dû être annulés (n=469) pour cause de mauvaise ou d’hyper réponse à la stimulation, 3113 ponctions ont été réalisées, dont 801 sans transfert (freeze-all, donneuses d’ovocytes, DPI sans embryon sain, congélation de zygotes ou plus rarement échecs de fécondation ou de culture prolongée). Au total, 2312 transferts ont été effectués, desquels 996 ont été exclus, car ils ne répondaient pas aux critères d’inclusion de notre étude.

4. Schéma récapitulatif de l'étude (Flow Chart)



B. DÉROULEMENT D'UNE TENTATIVE DE FIV

1. Stimulation ovarienne

Les protocoles de stimulation utilisés étaient soit un protocole long agoniste soit un protocole antagoniste.

En cas de protocole long agoniste, la désensibilisation hypophysaire a été réalisée par une ou plusieurs injections de Triptoréline (Décapeptyl® 3mg ou 0,1mg, Ipsen Biotech, Paris, France). Le blocage de la fonction ovarienne a été confirmé par des dosages hormonaux (œstradiol, progestérone et LH) et une échographie endovaginale qui a permis de vérifier l'absence de kyste ovarien ainsi que la présence d'une épaisseur endométriale de moins de 5mm. Une fois la désensibilisation hypophysaire confirmée, la stimulation ovarienne a été débutée par l'administration quotidienne sous-cutanée de FSH. La FSH était soit une hMG (Ménotropine- Ménopur®, Ferring, Gentilly, France), soit une rFSH (Follitropine alpha-GonalF® Merck-Serono, Boulogne, France ; Puregon®, Organon, Puteaux, France). En cas d'utilisation d'une rFSH, l'administration de 75UI quotidienne de LH recombinante (Luveris® Merck-Serono, Boulogne, Gentilly, France) a été associée à partir du 6^{ème} jour de stimulation.

En cas de protocole antagoniste, la stimulation ovarienne a été débutée le deuxième jour du cycle selon les mêmes modalités que le protocole agoniste. La désensibilisation hypophysaire a été commencée vers le 6^{ème} jour de la stimulation avec une ou plusieurs injections d'acétate de cétrorélix (Cétrotide® Merck-Serono, Boulogne, Gentilly, France).

Le traitement et la fréquence du monitorage a été adaptée à chaque patiente en fonction des dosages hormonaux (Oestradiol, LH, progestérone) et de l'échographie (nombre et taille des follicules). Le déclenchement de l'ovulation par l'administration d'hCG intramusculaire (5000 ou 10000UI) a été réalisé lorsqu'un minimum de 4 follicules pré-ovulatoires (16-22mm) étaient visualisés, avec un taux d'œstradiol par follicule supérieur à 200pg/ml et une épaisseur endométriale supérieure à 6mm.

2. Ponction et recueil folliculaire

La ponction ovocytaire a été effectuée par voie transvaginale échoguidée, 36 heures après l'injection d'hCG, grâce à une aiguille de ponction simple lumière soumise à une pression d'aspiration de 7,5 kPa. La recherche des complexes cumulo-ovocytaires (CCO) dans le liquide folliculaire a été réalisée

sous loupe binoculaire. Les CCO retrouvés ont été rincés et déposés au fur et à mesure dans une boîte de culture contenant 3ml d'IVF medium (Origio, Lyon, France) préalablement gazé et chauffé à 37°C. Une fois la recherche terminée, la boîte de culture a été déposée dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO₂.

3. Préparation de sperme

Le recueil de sperme a été réalisé au laboratoire par masturbation. Après liquéfaction à 37°C pendant 30 minutes, les principaux paramètres spermatiques (concentration, mobilité et vitalité) ont été évalués. Les spermatozoïdes ont ensuite été sélectionnés par gradient de densité bicouche (45% et 90%) de PureSperm® (Nidacon, JCD, Lyon, France) puis lavés dans du milieu capacitant Ferticult (Fertipro, JCD, Lyon, France).

4. Mise en fécondation

Le choix de la technique de fécondation se base sur les résultats du bilan clinique et paraclinique du couple, ainsi que les antécédents de tentatives dans notre centre ou dans un centre extérieur.

a) Fécondation in vitro classique (FIVc)

Chaque CCO a été déposé dans une microgoutte numérotée de 40 µl d'Universal IVF (Origio, Lyon, France) sous huile minérale (Origio, Lyon, France) et inséminé avec 5000 à 7000 spermatozoïdes mobiles progressifs typiques puis placé dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO₂.

b) Fécondation in vitro avec micro injection (ICSI)

Une heure après la fin du recueil ovocytaire, les CCO ont été décoronisés par action mécanique et enzymatique (Hyaluronidase, Origio, Lyon, France) à l'aide d'un stripper 150µm. Une heure après la fin de la décoronation, les ovocytes en métaphase II ont été injectés (Microscope Olympus, pipette Humagen Origio).

5. Culture embryonnaire

a) Observation de la fécondation

Entre 19 à 20 heures post insémination en FIVc, les ovocytes ont été dénudés par pipetage mécanique grâce à des capillaires de 150 µm de diamètre (stripper, JCD, Lyon, France) puis rincés et placés dans des microgouttes de nouveau milieu de 40 µl de One Step (SAGE Origio, Lyon, France) sous huile. C'est un milieu unique, apportant tous les nutriments nécessaires pour le développement embryonnaire de J1 à J6.

La fécondation a été objectivée par l'observation de deux pronuclei PN (mâle et femelle) et de l'expulsion du 2^{ème} globule polaire (GP) sous un microscope inversé (Nikon TE 300) à l'objectif x40.

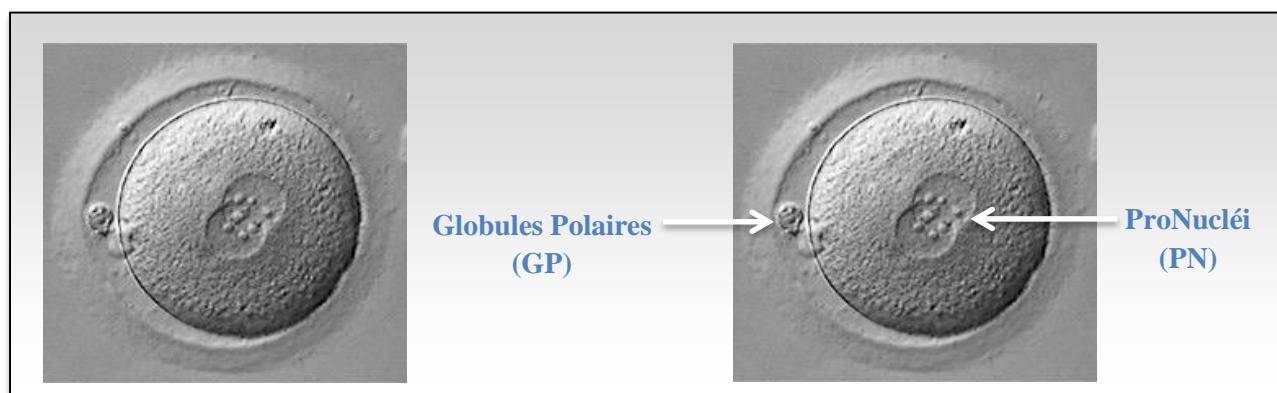


Figure 1 : Ovocyte fécondé observé 20 heures après insémination (Stade zygote)

b) Observation embryonnaire

L'observation de la morphologie embryonnaire au microscope tient une place privilégiée.

C'est une méthode non invasive, simple et rapide, permettant de décider du devenir des embryons parmi les choix suivants : transfert, congélation ou arrêt de culture. Il s'agit d'une méthode subjective, opérateur et laboratoire dépendant.

- **Clivage précoce J1**

A la 27^{ème} heure post insémination, la présence ou non du clivage précoce a été observée sous microscope inversé (Nikon TE 300) à l'objectif x40.

Les différents stades observés correspondaient soit à une persistance des pronucléi (stade 2PN), soit à leur effacement (stade BD ou break-down), soit à un clivage précoce embryonnaire. Dans ce dernier cas, le nombre de blastomères, leur régularité et le taux de fragmentation étaient notés.

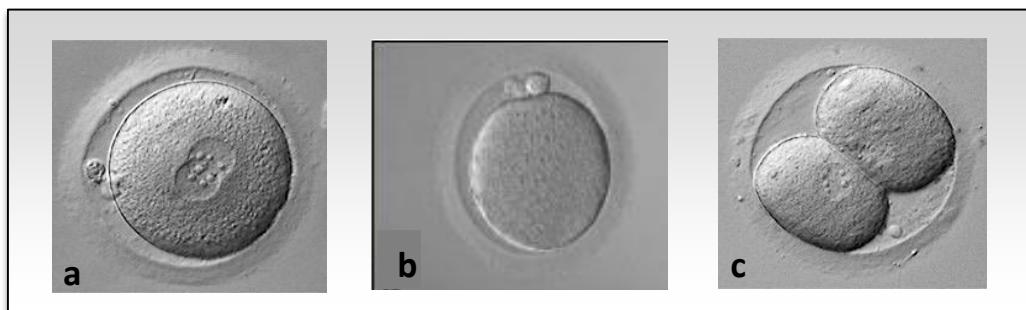


Figure 2 : Observation à la 27ème heure après insémination.
(a) Stade 2PN. (b) Stade BD. (c) Clivage précoce.

- **Observation embryonnaire à J2 et J3**

Les embryons ont été cultivés dans des microgouttes de 40 µl de milieu unique One Step (SAGE Origio, Lyon, France) jusqu'à J2 ou J3.

La morphologie embryonnaire a été évaluée à J2 et J3 sous microscope inversé (Nikon TE 300) à l'objectif x40 en utilisant une classification basée sur :

- le nombre de blastomères,
- la typicité du clivage,
- le pourcentage de fragments anucléés,
- la présence ou non de blastomères multinucléés.

Plusieurs auteurs ont décrit l'importance de certains critères dans la survenue de l'implantation. La régularité de la taille des blastomères à J2 est en relation avec une augmentation du taux de grossesse post-AMP (*Hardarson et al. 2001 ; Holte et al. 2007*).

Un clivage aboutissant à des cellules de tailles différentes entraîne une distribution différente des molécules cytoplasmiques (protéines, ARNm...), ce qui augmente l'incidence de blastomères multinucléés et d'aneuploïdie et diminue les taux d'implantation (*Hardarson et al. 2001 ; Magli et al. 2001 ; Van Royen et al. 2001 ; Scott et al. 2007*).

La proportion de fragments dans le volume intra-pellucidaire est largement utilisée pour prédire le potentiel d'implantation des embryons et est liée à l'aneuploïdie (*Ebner et al. 2001 ; Ziebe et al. 2003 ; Munne et al. 2006*). Si la fragmentation n'atteint pas 10% du volume total de l'embryon, il est convenu

qu'elle n'a pas d'impact sur le potentiel de développement de l'embryon (*Van Royen et al. 2001, Holte et al. 2007*).

La multinucléation a été décrite comme étant liée à des anomalies chromosomiques de l'embryon (*Hardarson et al. 2001*). Des analyses génétiques, révélant une élévation des taux d'aneuploïdie, d'anomalies chromosomiques et de défauts dans la synthèse d'ADN, sont à l'origine d'une baisse des taux de grossesse et d'implantation après leur transfert (*Hardarson et al. 2003*).

Ces études isolées ont fini par aboutir à l'établissement d'un Consensus à l'échelle européenne (*Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011*). Les embryons sont définis comme étant « Top » ou « Non Top » selon leurs caractéristiques morphologiques.

Ainsi 5 grades ont été définis :

GRADES	A		B		C+		C-		D
Nombre de blastomères	J2		J3		J2		J3		
	4	7-8	4-5	7-8	4-5	≥6	J2/J3		
Clivage	Typique		Typique		Typique		Typique	Atypique	
% fragments anucléés	-		<10%		10-25%		26-50%	0-50%	>50%
BMN	-		-		-		Ou +		+/-
					Embryons « Top »		Embryons « Non Top »		

Tableau 1 : Classification des embryons selon leurs critères morphologiques au stade clivé (J2/J3).

- **A** : 4 blastomères à J2 ou 7-8 blastomères à J3, clivage typique, absence de fragments anucléés et de BMN.

- **B** : 4-5 blastomères à J2 ou 7-8 blastomères à J3, clivage typique, < 10% de fragments anucléés et absence de BMN.

- **C+** : 4-5 blastomères à J2 ou ≥ 6 blastomères à J3, clivage typique, 10% à 25% de fragments anucléés et absence de BMN.
- **C-** : clivage typique associé à 30 à 50% de fragments anucléés ou clivage atypique avec moins de 50% de fragments anucléés ou présence de blastomères multinucléés.
- **D** : > 50% de fragments anucléés, avec ou sans BMN.

Les embryons de grades **A**, **B** et **C+** étaient considérés comme des embryons « **Top** » à potentiel implantatoire plus élevé (*Holte et al. 2007*).

Les grades **C-** et **D** comme des embryons « **Non-Top** ».

Les embryons de grade **D** ne seront jamais transférés ni congelés, ils sont destinés à la destruction.

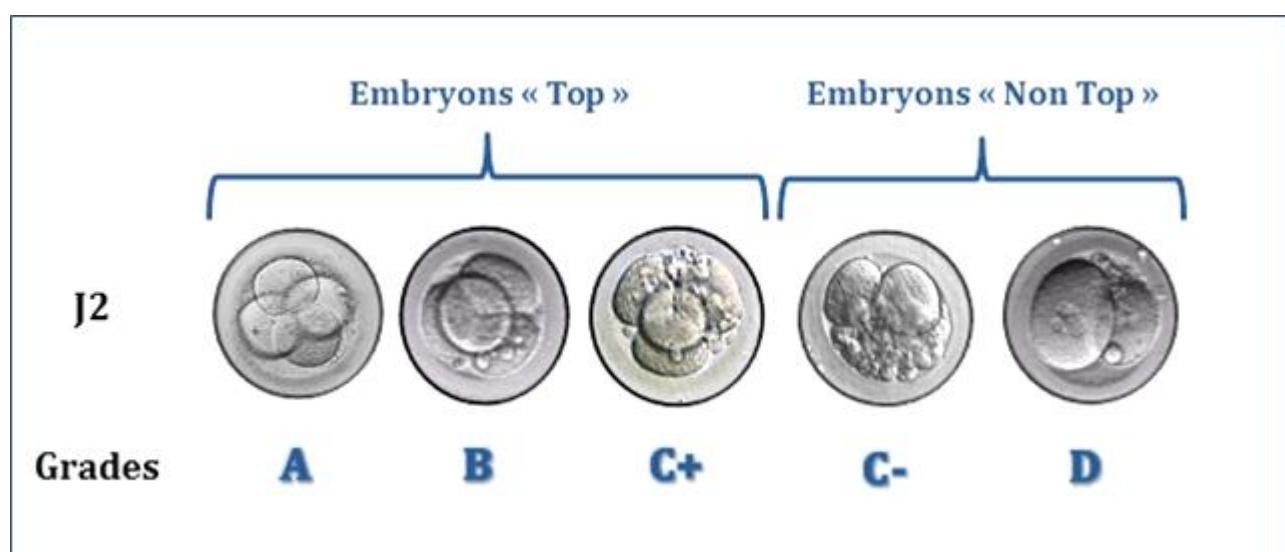


Figure 3 : Exemple de typage d'embryons selon leur morphologie observée à J2.

- **Observation embryonnaire au 5^{ème} jour (J5)**

Lorsqu'une culture prolongée a été indiquée, les embryons ont été cultivés dans des microgouttes de 40 µl de milieu unique (SAGE Origio, Lyon, France) jusqu'à J5.

La morphologie embryonnaire a été évaluée à J2 et J3 sous microscope inversé (Nikon TE 300) à l'objectif x40 en utilisant une classification précédente, puis à J5 en utilisant les critères de la classification de Gardner (*Gardner et Schoolcraft, 1999*), adaptée aux habitudes de lecture du laboratoire, et basée sur :

- le degré d'expansion de la cavité blastocœlique,
- la morphologie du bouton embryonnaire,
- le nombre et l'aspect des cellules formant le trophectoderme.

Cavité blastocœlique	Caractéristiques morphologiques
B1	Début de cavitation
B2	Cavité < 50% du volume intra-pellucidaire, sans expansion
B3	Cavité > 50%, sans expansion
B4	Blastocyste expansé, zone pellucide amincie
B5	Blastocyste en cours d'éclosion
B6	Blastocyste éclos

GRADES	Bouton embryonnaire (ICM)	Trophectoderme (T)
A	Bien visible, nombreuses cellules compactées	Cellules en croissant, formant un épithélium cohésif
B	Contour cellulaire visible	Cellules en croissant, formant un fin épithélium
C	Peu visible voire absent	Absence de cellules en croissant

Tableau 2 : Classification des embryons selon leurs critères morphologiques au stade de blastocyste (J5)

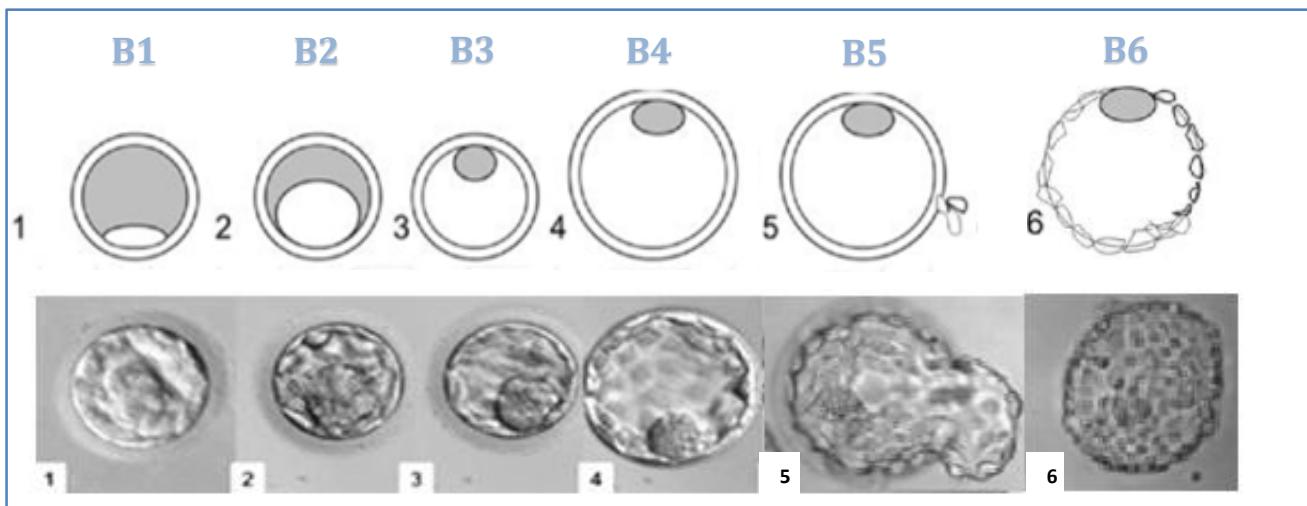


Figure 4 : Observation embryonnaire de l'évolution d'un blastocyste

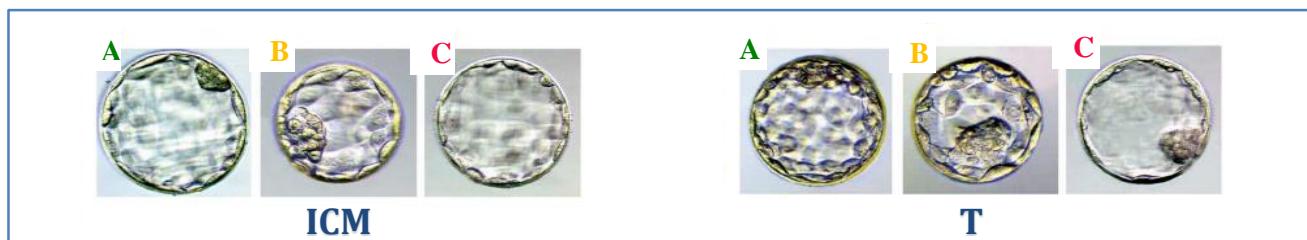


Figure 5 : Typage d'embryons selon leurs critères morphologiques

Ainsi sont considérés comme blastocystes « **Top** » (Grades **A, B, C+**) à J5: les blastocystes présentant une cavité blastocœlique débutante (B1) ou <50% (B2) typiques, ainsi que les blastocystes dont la cavité est plus développée (>50%, [B3-B6]) associée à un bouton embryonnaire bien visible, composé de cellules compactées ou aux contours cellulaires visibles (IA ou IB) et un trophoblaste comportant des cellules en croissant formant un épithélium cohésif ou fin (TA ou TB).

Sont considérés comme « **Non Top** » (Grade **C-, D**) : les blastocystes présentant une cavité blastocœlique débutante (B1) ou <50% (B2) non typiques, ainsi que les blastocystes dont la cavité est plus développée (>50%, [B3-B6]) associée à un bouton embryonnaire absent et/ou un trophectoderme sans cellule en croissant.

6. Transfert embryonnaire et issue de grossesse

Le choix du jour du transfert et du nombre d'embryons à transférer a été décidé en accord avec le clinicien et le couple en fonction du pronostic de la tentative, du déroulement des tentatives précédentes, de l'âge de la patiente, du souhait du couple et des risques obstétricaux de chaque patiente.

Lors d'une 1^{ère} tentative, le transfert au stade clivé (J2 ou J3) a été privilégié si le nombre d'ovocytes recueillis à la ponction est inférieur à 10. Les chances de grossesse ayant été montrées comme étant équivalentes à J2 et J3 (*Laverge et al. 2001 ; Brown Cochrane 2016 ; Lee et al. 2017*).

La culture prolongée jusqu'au 5^{ème} jour de développement a été décidée dans le cas où plus de 10 ovocytes ont été mis en fécondation, afin d'évaluer le potentiel évolutif des embryons, post-activation génomique à J3 (*Braude et al. 1988*).

A J2, J3 ou J5, les embryons candidats au transfert ont été choisis en fonction de leur morphologie et de leur cinétique de développement (prise en compte du clivage précoce).

Ils ont été placés dans une microgoutte de 35 µL d'UTM (Origio, Lyon, France) sous huile. Le transfert a été réalisé par un gynécologue sous contrôle échographique, en utilisant un cathéter de Frydman (CCD, France).

Un dosage sanguin de βhCG plasmatiques a été effectué 10 jours post-transfert en cas de blastocystes, et 13 jours post-transfert en cas d'embryons clivés, puis répété 2 fois à 2 jours d'intervalle afin d'apprécier l'évolution de la cinétique hormonale.

En cas de dosage évolutif, une échographie pelvienne a été réalisée à 6 semaines d'aménorrhée (SA) pour compter le nombre de sacs gestationnels et détecter l'activité cardiaque fœtale.

C. CRITERES EVALUÉS

1. Valeur Prédictive Positive

La VPP a été définie comme la probabilité qu'un embryon « Top » s'implante.

$$VPP = \frac{\text{Embryons "Top" implantés (VP)}}{\text{VP} + \text{Embryons "Top" non implantés (FP)}}$$

VP : Vrais Positifs
FP : Faux Positifs

2. Valeur Prédictive Négative

La VPN a été définie comme la probabilité qu'un embryon « Non Top » ne s'implante pas.

$$VPN = \frac{\text{Embryons "Non Top" non implantés (VN)}}{\text{VN} + \text{Embryons "Non Top" implantés (FN)}}$$

VN : Vrais Négatifs
FN : Faux Négatifs

3. Sensibilité

La sensibilité a été définie comme la probabilité qu'en cas d'implantation, l'embryon transféré soit « Top ».

$$Se = \frac{\text{Embryons "Top" implantés (VP)}}{\text{VP} + \text{Embryons "Non Top" implantés (FN)}}$$

4. Spécificité

La spécificité a été définie comme la probabilité qu'en cas de non implantation, l'embryon transféré soit « Non Top ».

$$Sp = \frac{\text{Embryons "Non Top" non implantés (VN)}}{\text{VN} + \text{Embryons "Top" non implantés (FP)}}$$

5. Taux de Grossesse clinique / Transfert

Une grossesse **clinique** est définie par un taux de β hCG ≥ 5 UI/L au 1^{er} dosage, et > 1000 UI/L au 3^{ème} dosage, associés à la présence à l'échographie d'un sac gestationnel intra-utérin avec activité cardiaque, réalisée vers la 6^{ème} semaine d'aménorrhée (6SA).

$$Gr / T = \frac{\text{Nombre de transferts ayant abouti à une grossesse clinique}}{\text{Nombre total de transferts}}$$

Une grossesse **biochimique** est définie par un taux de β hCG < 1000U/L au 3^{ème} dosage et diminuant rapidement, sans visualisation de sac gestationnel à l'échographie.

L'évolution du taux des β hCG suffit souvent à définir une grossesse comme étant biochimique et l'échographie n'est que très rarement réalisée dans ces cas-là.

Les études sont peu nombreuses et peu concluantes sur ce sujet, c'est pourquoi elle sera considérée comme une absence de grossesse dans notre étude.

6. Taux de Grossesse Gémellaire / Grossesse

$$\text{Gr Gem / Gr} = \frac{\text{Nombre de transferts ayant abouti à une grossesse clinique gémellaire}}{\text{Nombre de grossesses cliniques}}$$

7. Taux de Fausse Couche Spontanée (FCS) / Grossesse

Une FCS correspond à l'interruption spontanée d'une grossesse évolutive avant 22SA (*OMS*).

$$\text{FCS / Gr} = \frac{\text{Nombre de transferts ayant abouti à une FCS}}{\text{Nombre de grossesses cliniques}}$$

8. Taux de Grossesse Extra-Utrérine (GEU) / Grossesse

Une GEU, ou grossesse ectopique, correspond à une implantation embryonnaire située en dehors de la cavité utérine : elle peut être tubaire, ovarienne, cervicale, abdominale ou intra-murale.

$$\text{GEU / Gr} = \frac{\text{Nombre de transferts ayant abouti à une GEU}}{\text{Nombre de grossesses cliniques}}$$

9. Taux d'Interruption Médicale de Grossesse (IMG) / Grossesse

Une IMG médicamenteuse ou chirurgicale peut être décidée pour la santé de la mère et/ou de l'enfant à naître. Elle peut être réalisée à n'importe quel moment de la grossesse.

$$\text{IMG / Gr} = \frac{\text{Nombre de transferts ayant abouti à une IMG}}{\text{Nombre de grossesses cliniques}}$$

10. Taux d'accouchement / Transfert

$$\text{Acc / T} = \frac{\text{Nombre de transferts ayant abouti à un accouchement}}{\text{Nombre total de transferts}}$$

D. ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel Graphpad Prism (V7.04).

Les variables étudiées étant qualitatives, nous avons utilisé les tests statistiques suivants : le test du Chi2, pour les grands effectifs (>5) et le test de Fisher, pour les petits effectifs (<5).

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

PARTIE IV : RESULTATS

Parmi les 1316 transferts étudiés, l'âge médian des patientes était de 35 ans (âges extrêmes : 19-44ans) et le rang moyen des tentatives était de 2,3 (rangs extrêmes : 1-11).

A. EMBRYONS « TOP »

1. Résultats globaux

SET			
	J2/J3	J5	<i>p</i>
Nb de transferts	116	86	
Nb E transférés	116	86	
Nb E implantés	36	40	
VPP	31%*	47%*	<0.05
Faux Positifs	69%*	53%*	<0.05
Nb de grossesses cliniques (%^T)	36 (31%)*	40 (47%)*	<0.05
Nb de grossesses gémellaires (%^G)	0	2 (5%)	<i>NS</i> (>0.05)
Nb de FCS (%^G)	14 (39%)*	7 (18%)*	<0.05
Nb de GEU (%^G)	0	0	<i>NS</i>
Nb d'IMG (%^G)	0	2 (5%)	<i>NS</i>
Nb d'Accouchements (%^T)	22 (19%)*	31 (36%)*	<0.01
DET			
Nb de transferts	336	192	
Nb E transférés	672	384	
Nb E implantés	244	166	
VPP	36%*	43%*	<0.05
Faux Positifs	64%*	57%*	<0.05
Nb de grossesses cliniques (%^T)	189 (56%)	117 (61%)	<i>NS</i>
Nb de grossesses gémellaires (%^G)	55 (29%)*	49 (42%)*	<0.05
Nb de FCS (%^G)	26 (14%)*	27 (23%)*	<0.05
Nb de GEU (%^G)	5 (3%)	1 (1%)	<i>NS</i>
Nb d'IMG (%^G)	1 (0.5%)	3 (3%)	<i>NS</i>
Nb d'Accouchements (%^T)	157 (47%)	86 (45%)	<i>NS</i>

%^T : Pourcentage par transfert

%^G : Pourcentage par grossesse

* : Différence significative entre les stades clivés (J2/J3) et blastocyste (J5)

Tableau 3 : Résultats Embryons « Top »

En SET, nous avons étudié 202 transferts d'embryons « Top », 116 au stade clivé et 86 au stade blastocyste. Nous avons retrouvé un avantage significatif du transfert au stade de blastocyste en terme

de VPP, de taux de grossesse clinique ($p<0.05$) et de taux d'accouchement ($p<0.01$). A noter qu'au stade clivé, le risque de FCS était significativement plus important qu'au stade de blastocyste ($p<0.05$).

⇒ **Ces résultats permettent de s'orienter vers un transfert après culture prolongée en SET.**

Cette stratégie offre aux patientes 47% de chances de grossesses et 36% de naissances vivantes.

En **DET**, nous avons étudié 528 transferts d'embryons « Top », 336 au stade clivé et 192 au stade blastocyste. Nous avons retrouvé des différences significatives pour les paramètres suivants :

Une VPP plus élevée au stade blastocyste, associée à un risque de grossesse gémellaire et de FCS plus importants qu'au stade clivé ($p<0.05$). En revanche les taux de grossesse clinique et d'accouchement étaient comparables.

⇒ **Ces résultats suggèrent de s'orienter vers un transfert au stade clivé en DET.**

Cette stratégie offre aux patientes 56% de chances de grossesses et 47% de naissances vivantes.

2. Embryons « Top » en fonction de l'âge des patientes

SET				
AGE	J2/J3		J5	
	<35ans	>35ans	<35ans	>35ans
Nb de transferts	42	74	53	33
Nb E transférés	42	74	53	33
Nb E implantés	13	23	27	13
VPP	31%*	31%	51%*	39%
Faux Positifs	69%*	69%	49%*	61%
Nb de grossesses cliniques (% ^T)	13 (31%)*	23 (31%)	27 (51%)*	13 (39%)
Nb de grossesses gémellaires (% ^G)	0	0	0	2 (15%)
Nb de FCS (% ^G)	3 (23%)	11 (48%)	3 (11%)	4 (31%)
Nb de GEU (% ^G)	0	0	0	0
Nb d'IMG (% ^G)	0	0	1 (4%)	1 (8%)
Nb d'Accouchements (% ^T)	10 (24%)*	12 (16%)	23 (43%)*	8 (24%)
DET				
Nb de transferts	151	185	103	89
Nb E transférés	302	370	206	178
Nb E implantés	133	111	90	76
VPP	44%	30% ^Φ	44%	43% ^Φ
Faux Positifs	56%	70% ^Φ	56%	57% ^Φ
Nb de grossesses cliniques (% ^T)	100 (66%)	89 (48%)	63 (61%)	54 (61%)
Nb de grossesses gémellaires (% ^G)	33 (33%)	22 (25%) ^Φ	27 (43%)	22 (41%) ^Φ
Nb de FCS (% ^G)	12 (12%)	14 (16%)	14 (22%)	13 (24%)
Nb de GEU (% ^G)	2 (2%)	3 (3%)	0	1 (2%)
Nb d'IMG (% ^G)	0	1 (1%)	2 (3%)	1 (2%)
Nb d'Accouchements (% ^G)	86 (57%)*	71 (38%)	47 (46%)*	39 (44%)

%^T : Pourcentage par transfert

%^G : Pourcentage par grossesse

Tableau 4 : Résultats Embryons « Top » en fonction de l'âge des patientes

* : Différence significative entre les stades clivés (J2/J3) et blastocyste (J5) chez les patientes < 35ans ($p < 0.05$)

^Φ : Différence significative entre les stades clivés (J2/J3) et blastocyste (J5) chez les patientes > 35ans ($p < 0.05$)

Pour les patientes de moins de 35 ans :

- En **SET**, nous avons retrouvé un avantage significatif du transfert au stade de blastocyste en terme de VPP, de taux de grossesse clinique et de taux d'accouchement.

⇒ Ces résultats permettent de s'orienter vers un transfert après culture prolongée en **SET**.

- En **DET**, nous avons étudié 254 transferts d'embryons « Top », 151 au stade clivé et 103 au stade blastocyste. Nous avons retrouvé un taux d'accouchement significativement plus élevé pour les transferts au stade clivé ($p < 0.05$).

⇒ Ces résultats permettent de s'orienter vers un transfert après culture précoce en **DET**.

Chez les patientes de **plus de 35 ans** :

- En **DET**, nous avons étudié 274 transferts d'embryons « Top », 185 au stade clivé et 89 au stade blastocyste. Nous avons retrouvé des différences significatives pour les paramètres suivants : Une VPP supérieure au stade blastocyste ($p<0.01$), associé à un risque de grossesse gémellaire plus élevé ($p<0.05$), pour un taux de grossesse et d'accouchement équivalents.

⇒ **Ces résultats permettent de s'orienter vers un transfert après culture précoce en DET.**

3. Embryons Top en fonction du rang de tentative

SET						
RANGS	J2/J3			J5		
	1-2	3-4	≥5	1-2	3-4	≥5
Nb de transferts	76	31	9	67	14	5
Nb E transférés	76	31	9	67	14	5
Nb E implantés	25	8	3	30	8	2
VPP	33%	26%^Φ	33%	45%	57%^Φ	40%
Faux Positifs	67%	74%^Φ	67%	55%	43%^Φ	60%
Nb de grossesses cliniques (% ^T)	25 (33%)	8 (26%)^Φ	3 (33%)	30 (45%)	8 (57%)^Φ	2 (40%)
Nb de grossesses gémellaires (% ^G)	0	0	0	1 (3%)	1 (13%)	0
Nb de FCS (% ^G)	7 (28%)	5 (62%)	2 (67%)	4 (13%)	3 (38%)	0
Nb de GEU (% ^G)	0	0	0	0	0	0
Nb d'IMG (% ^G)	0	0	0	1 (3%)	0	1 (50%)
Nb d'Accouchements (% ^T)	18 (24%)	3 (10%)	1 (11%)	25 (37%)	5 (36%)	1 (20%)
DET						
RANGS	J2/J3			J5		
	1-2	3-4	≥5	1-2	3-4	≥5
Nb de transferts	254	70	12	140	44	8
Nb E transférés	508	140	24	280	88	16
Nb E implantés	179	52	13	125	36	5
VPP	35%*	37%	54%	45%*	41%	31%
Faux Positifs	65%*	63%	46%	55%*	59%	69%
Nb de grossesses cliniques (% ^T)	139 (55%)	41 (59%)	9 (75%)	86 (61%)	27 (61%)	4 (50%)
Nb de grossesses gémellaires (% ^G)	40 (29%)*	11 (27%)	4 (44%)	39 (45%)*	9 (33%)	1 (25%)
Nb de FCS (% ^G)	22 (16%)	3 (7%)	1 (11%)	19 (22%)	7 (26%)	1 (25%)
Nb de GEU (% ^G)	1 (1%)	3 (7%)	1 (11%)	1 (1%)	0	0
Nb d'IMG (% ^G)	1 (1%)	0	0	1 (1%)	2 (7%)	0
Nb d'Accouchements (% ^T)	115 (45%)	35 (50%)	7 (58%)	65 (46%)	18 (41%)	3 (38%)

%^T : Pourcentage par transfert

%^G : Pourcentage par grossesse

Tableau 5 : Résultats Embryons « Top » en fonction du rang de tentative

* : Différence significative entre les stades clivés (J2/J3) et blastocyste (J5) / tentatives de rangs [1-2] (p<0.05)

Φ : Différence significative entre les stades clivés (J2/J3) et blastocyste (J5) / tentatives de rangs [3-4] (p<0.05)

En **SET**, nous avons retrouvé un avantage significatif du transfert au stade de blastocyste en terme de VPP, de taux de grossesse clinique et de taux d'accouplement pour les tentatives de rangs 3 et 4 mais pas pour les rangs 1 et 2.

En **DET**, nous avons retrouvé une augmentation significative de la VPP au stade de blastocyste, ainsi qu'un risque de grossesse gémellaire plus élevé sans avantage en terme d'accouplement pour les tentatives de rangs 1 et 2.

4. Résultats en fonction du transfert sélectif ou non d'un embryon

ES (Elective SET) : Transfert Electif ; NES (Non Elective SET) : Transfert Non Electif

SET				
	J2/J3		J5	
	ES	NES	ES	NES
Nb de transferts	23	93	70	16
Nb E transférés	23	93	70	16
Nb E implantés	7	29	34	6
VPP	30%	31%	37%	38%
Faux Positifs	70%	69%	63%	62%
Nb de grossesses cliniques (%^T)	7 (30%)	29 (31%)	34 (37%)	6 (38%)
Nb de grossesses gémellaires (%^G)	0	0	2 (6%)	0
Nb de FCS (%^G)	3 (43%)	11 (38%)	7 (21%)	0
Nb de GEU (%^G)	0	0	0	0
Nb d'IMG (%^G)	0	0	2 (6%)	0
Nb d'Accouchements (%^T)	4 (17%)	18 (19%)	25 (36%)	6 (38%)

%^T : Pourcentage par transfert

%^G : Pourcentage par grossesse

Tableau 6 : Résultats en eSET ou non eSET

Aucune différence significative n'a été retrouvée lors de l'analyse des transferts d'embryons « Top » en eSET ou non eSET, entre les stades embryon clivé et blastocyste. Cependant, les effectifs étant relativement faibles, nous ne pouvons pas utiliser ces résultats pour adapter notre politique de transfert avec les cliniciens ou lors de la consultation avec les couples infertiles.

B. EMBRYONS « NON TOP »

1. Résultats globaux

SET			
	J2/J3	J5	p
Nb de transferts	130	41	
Nb E transférés	130	41	
Nb E implantés	22	8	
Faux Négatifs	17%	20%	NS (>0.05)
VPN	83%	80%	NS
Nb de grossesses cliniques (%^T)	22 (17%)	8 (20%)	NS
Nb de grossesses gémellaires (%^G)	0	0	NS
Nb de FCS (%^G)	6 (27%)	2 (25%)	NS
Nb de GEU (%^G)	2 (9%)	0	NS
Nb d'IMG (%^G)	0	0	NS
Nb d'Accouchements (%^T)	14 (11%)	6 (15%)	NS
DET			
Nb de transferts	279	50	
Nb E transférés	558	100	
Nb E implantés	104	18	
Faux Négatifs	19%	18%	NS
VPN	81%	82%	NS
Nb de grossesses cliniques (%^T)	88 (32%)	16 (32%)	NS
Nb de grossesses gémellaires (%^G)	16 (18%)	2 (13%)	NS
Nb de FCS (%^G)	19 (22%)	4 (25%)	NS
Nb de GEU (%^G)	3 (3%)	0	NS
Nb d'IMG (%^G)	1 (1%)	1 (6%)	NS
Nb d'Accouchements (%^G)	65 (23%)	11 (22%)	NS

%^T : Pourcentage par transfert

%^G : Pourcentage par grossesse

Tableau 7 : Résultats Embryons « Non Top »

En **SET**, nous avons étudié 171 transferts d'embryon « Non Top », 130 au stade clivé et 41 au stade blastocyste. Nous n'avons retrouvé aucune différence significative pour les paramètres analysés entre les stades embryons clivé et blastocyste.

En **DET**, nous avons étudié 329 transferts d'embryons « Non Top », 279 au stade clivé et 50 au stade blastocyste. Nous n'avons retrouvé aucune différence significative pour les paramètres analysés entre les stades embryon clivé et blastocyste.

Toutefois, comparativement au **SET**, il y a une amélioration significative des taux de grossesse et d'accouchement lorsqu'on transfère 2 embryons au stade clivé (17% versus 32%, $p=0.002$ et 11% versus 23%, $p=0.03$ respectivement), cette attitude s'accompagne d'une élévation du risque de grossesse gémellaire de 18% alors qu'il n'y en a eu aucune lors de **SET** ($p=0.04$).

⇒ **Ce résultat suggère qu'il n'y a donc pas d'avantage à continuer la culture jusqu'à J5 pour les embryons « Non Top » qui pourraient être transférés dès le stade clivé, afin d'éviter une exposition in vitro prolongée inutile de l'embryon.**

Cependant, lorsque la cohorte embryonnaire est importante, une culture prolongée pourrait être envisagée dans l'espérance d'obtenir un blastocyste « Top » et d'éviter le transfert de 2 embryons.

2. Embryons « Non Top » en fonction de l'âge des patientes

SET				
AGE	J2/J3		J5	
	<35ans	>35ans	<35ans	>35ans
Nb de transferts	34	96	14	27
Nb E transférés	34	96	14	27
Nb E implantés	8	14	4	4
Faux Négatifs	24%	15%	29%	15%
VPN	76%	85%	71%	85%
Nb de grossesses cliniques (% ^T)	8 (24%)	14 (15%)	4 (29%)	4 (15%)
Nb de grossesses gémellaires (% ^G)	0	0	0	0
Nb de FCS (% ^G)	1 (13%)	5 (36%)	1 (25%)	1 (25%)
Nb de GEU (% ^G)	2 (25%)	0	0	0
Nb d'IMG (% ^G)	0	0	0	0
Nb d'Accouchements (% ^T)	5 (15%)	9 (9%)	3 (21%)	3 (11%)
DET				
Nb de transferts	108	171	22	28
Nb E transférés	216	342	44	56
Nb E implantés	55	49	8	10
Faux Négatifs	25%	14%	18%	18%
VPN	75%	86%	82%	82%
Nb de grossesses cliniques (% ^T)	45 (42%)	43 (25%)	6 (27%)	10 (36%)
Nb de grossesses gémellaires (% ^G)	10 (22%)	6 (14%)	2 (33%)	0
Nb de FCS (% ^G)	10 (22%)	9 (21%)	2 (33%)	2 (20%)
Nb de GEU (% ^G)	1 (2%)	2 (5%)	0	0
Nb d'IMG (% ^G)	0	1 (2%)	0	1 (10%)
Nb d'Accouchements (% ^T)	34 (31%)	31 (18%)	4 (18%)	7 (25%)

%^T : Pourcentage par transfert

%^G : Pourcentage par grossesse

Tableau 8 : Résultats Embryons « Non Top » en fonction de l'âge des patientes

En **SET** et en **DET**, selon la tranche d'âge des patientes, nous n'avons retrouvé aucune différence significative pour les paramètres analysés entre les stades embryo clivé et blastocyste.

3. Embryons « Non Top » en fonction du rang de tentative

SET						
RANGS	J2/J3			J5		
	1-2	3-4	≥5	1-2	3-4	≥5
Nb de transferts	63	52	15	23	15	3
Nb E transférés	63	52	15	23	15	3
Nb E implantés	11	9	2	4	3	1
Faux Négatifs	17%	17%	13%	17%	20%	33%
VPN	83%	83%	87%	87%	80%	77%
Nb de grossesses cliniques (% ^T)	11 (17%)	9 (17%)	2 (13%)	4 (17%)	3 (20%)	1 (33%)
Nb de grossesses gémellaires (% ^G)	0	0	0	0	0	0
Nb de FCS (% ^G)	4 (36%)	1 (11%)	1 (50%)	2 (50%)	0	0
Nb de GEU (% ^G)	1 (9%)	1 (11%)	0	0	0	0
Nb d'IMG (% ^G)	0	0	0	0	0	0
Nb d'Accouchements (% ^T)	6 (9%)	7 (13%)	1 (7%)	2 (9%)	3 (20%)	1 (33%)
DET						
Nb de transferts	188	68	23	26	19	5
Nb E transférés	376	136	46	52	38	10
Nb E implantés	78	21	5	5	11	2
Faux Négatifs	21%	15%	11%	10%	29%	20%
VPN	79%	85%	89%	90%	71%	80%
Nb de grossesses cliniques (% ^T)	65 (35%)	18 (26%)	5 (22%)	4 (15%)	10 (53%)	2 (40%)
Nb de grossesses gémellaires (% ^G)	13 (20%)	3 (17%)	0	1 (25%)	1 (10%)	0
Nb de FCS (% ^G)	14 (22%)	4 (22%)	1 (20%)	0	3 (30%)	1 (50%)
Nb de GEU (% ^G)	2 (3%)	0	1 (20%)	0	0	0
Nb d'IMG (% ^G)	0	1 (6%)	0	0	0	1 (50%)
Nb d'Accouchements (% ^T)	49 (26%)	13 (19%)	3 (13%)	4 (15%)	7 (37%)	0

%^T : Pourcentage par transfert

%^G : Pourcentage par grossesse

Tableau 9 : Résultats Embryons « Non Top » en fonction du rang de tentative

En **SET** et en **DET**, le rang de tentative ne semble pas impacter les paramètres étudiés.

C. CAS PARTICULIER DES TET

Le transfert de 3 embryons correspond à 6% de la totalité des transferts réalisés dans le centre. Il a été pratiqué majoritairement avec des embryons « Non Top » (71% des cas) et pour des patientes de plus de 35ans au cours d'une tentative de rang ≥ 3 .

Vingt-cinq transferts ont concerné des embryons « Top », 22 au stade clivé et 3 au stade blastocyste. Soixante et un transferts ont concerné des embryons « Non Top », 53 au stade clivé et 8 au stade blastocyste.

Nous avons obtenu 34 grossesses (39%) dont 4 gémellaires (11%).

A noter, une diminution au fil des ans de la pratique du TET : 43 TET ont été réalisés en 2014, puis 25 en 2015 et 18 en 2016. Nous avons donc considéré que le TET était pratiqué de manière exceptionnelle et ne méritait pas une étude aussi poussée que pour les SET et les DET.

D. COMPARAISON DES TAUX DE FCS

	J2/J3	J5	<i>p</i>
« Top »	(40/225) 18%	(34/157) 22%	<i>NS (0.09)</i>
« Non Top »	(25/110) 23%	(6/24) 25%	<i>NS (0.06)</i>
<i>p</i>	<i>NS (0.07)</i>	<i>NS (0.13)</i>	
Total embryons « Top » et « non Top »	(65/335) 19%	(40/181) 22%	<i>NS (0.09)</i>

Tableau 10 : Taux de FCS en fonction de la morphologie embryonnaire et du stade de développement

En regroupant les SET et les DET, les taux de FCS étaient similaires entre les embryons « Top » et entre les embryons « Non Top », au stade clivé ($p=0,07$) ou au stade de blastocyste ($p=0,13$).

Pour les embryons « Top », les taux de FCS étaient similaires entre le stade clivé et blastocyste ($p=0,09$), ainsi que pour les embryons « Non Top » ($p= 0,06$).

Enfin, en poolant les embryons quelle que soit leur morphologie, les taux de FCS observés au stade clivé était de 19% et de 22% pour le stade de blastocyste ($p =0,09$).

E. PERFORMANCES DU TEST

	SET		DET	
	J2/J3	J5	J2/J3	J5
Sensibilité $\frac{VP}{VP+FN}$	62% $\frac{36}{36+22}$	83% $\frac{40}{40+8}$	70% $\frac{244}{244+104}$	90% $\frac{166}{166+18}$
Spécificité $\frac{VN}{VN+FP}$	57% $\frac{108}{108+80}$	42% $\frac{33}{33+46}$	51% $\frac{454}{454+428}$	27% $\frac{82}{82+218}$

Tableau 11 : Performances du test : Sensibilité et Spécificité

La sensibilité du test est meilleure au stade de blastocyste qu'au stade clivé, en raison du plus faible nombre de faux négatifs à ce stade. Cela signifie probablement que les embryons « Non Top » sont bien gradés lors de l'observation morphologique au microscope.

En revanche, la spécificité de notre méthode d'évaluation de la morphologie embryonnaire est faible en raison du nombre élevé de faux positifs (embryons « Top » en échec d'implantation), et ce, quelque soit le stade de développement embryonnaire.

PARTIE V : DISCUSSION

A. PRINCIPAUX RESULTATS

Nos résultats ont montré que l'observation de la morphologie embryonnaire joue un rôle important dans la sélection des embryons candidats au transfert. En effet, nous avons observé des différences significatives ayant permis de proposer une stratégie de transfert selon le stade de développement de l'embryon et le nombre d'embryons à transférer.

Concernant les embryons « **Top** », en cas de **SET**, nous avons obtenu des résultats assez comparables avec l'étude préliminaire menée avant l'audit COFRAC, avec une VPP supérieure au stade de blastocyste. Ce résultat s'accompagnant d'un taux d'accouchement plus élevé et d'un taux de FCS diminué par rapport au stade clivé. Cet avantage se confirme pour les patientes de moins de 35ans et est comparable à la méta-analyse publiée récemment (*Glujovsky Cochrane 2016*).

Ces résultats suggèrent qu'en cas de programmation d'un SET, nous pourrions proposer de réaliser le transfert au stade de blastocyste.

En cas de **DET**, contrairement à l'étude préliminaire, nous retrouvons une meilleure VPP à J5, associée à un taux de grossesse également augmenté. Cependant, les risques de grossesse gémellaire et, de manière inattendue, de FCS, sont plus élevés au stade de blastocyste, ce qui aboutit à un taux d'accouchement équivalent entre les 2 stades de développement embryonnaire.

Ces résultats suggèrent qu'en cas de programmation d'un DET, nous pourrions proposer de réaliser le transfert au stade clivé.

Concernant les embryons « **Non Top** », comme dans l'étude préliminaire, nous n'avons retrouvé aucune différence significative sur les paramètres analysés, selon le stade de développement, et ce quels que soient l'âge de la patiente ou le rang de la tentative. Il n'y a donc pas d'avantage à réaliser une culture prolongée.

En regroupant les 2 stades de développement embryonnaire, les chances globales de grossesse et d'accouchement sont faibles en SET (18% et 12% respectivement). On note une amélioration significative de ces critères de jugement lorsqu'on transfère 2 embryons au stade clivé (32% et 23% respectivement), avec cependant un risque de grossesse gémellaire évalué à 18%, alors qu'il n'y en a eu aucune lors de SET. Ces résultats sont comparables avec la méta-analyse de Pandian et al. réalisée en 2013, qui retrouvait un taux de grossesse gémellaire de 13% en DET versus 0-2% en SET.

⇒ Ces résultats suggèrent que lorsqu'il n'y a que des embryons de bas grade dans une cohorte, nous pourrions proposer au couple de réaliser un transfert de 2 embryons au stade clivé, s'il est d'accord pour prendre le risque d'une grossesse gémellaire.

Néanmoins, au vu des faibles taux de grossesse et d'accouchement avec ces embryons, il faut se poser la question de réaliser une culture prolongée dans 2 situations :

- si la cohorte embryonnaire est importante, la sélection embryonnaire naturelle jusqu'à J5 nous permettrait de mieux orienter notre choix sur l'embryon candidat au transfert, du fait de la possibilité d'obtenir des blastocystes « Top » et ainsi éviter de réaliser un transfert de 2 embryons (*Shaw-Jackson et al. 2013 ; Poulain et al. 2014*).

- si la cohorte embryonnaire est constituée d'un faible nombre d'embryons et qu'il s'agit de la dernière tentative pour un couple, il peut être compréhensible de proposer une culture prolongée pour évaluer la capacité de développement des embryons et éviter un dernier transfert sans grandes chances de succès. Ceci est à prendre en considération sachant que la solidarité nationale ne s'applique plus après 4 tentatives avec transfert d'embryon sans succès.

Il paraît donc important de personnaliser l'information donnée au couple au cours de la prise en charge en AMP.

Dans le cadre du transfert d'embryons « Top » nous avons obtenu des différences significatives en terme de taux de FCS entre les 2 stades de développement. En SET nous avons observé une augmentation du taux de FCS dans le groupe clivé, alors que la proportion de patientes de plus de 35ans était équivalente dans chaque groupe.

L'augmentation des FCS en SET au stade clivé pourrait être attribuée au fait que les embryons à ce stade sont porteurs d'un taux d'aneuploïdie plus important qu'au stade de blastocyste (*Wang et al. 2011 ; Fragouli et al. 2014*). De manière surprenante, il a été observé une augmentation du taux de FCS en DET dans le groupe blastocyste ce résultat était connu pour les transferts de blastocystes décongelés (*Wang et al. 2011*), mais jamais rapporté dans la littérature concernant les transferts en frais (*Glujovsky et al 2016*).

Nous avons donc décidé d'analyser les résultats en regroupant les taux de FCS obtenus aux stades clivé et blastocyste, quel que soit le nombre d'embryon(s) transféré(s), puis quelle que soit la qualité embryonnaire et nous n'avons plus retrouvé de différence entre les 2 stades de développement. Ces résultats laissent supposer qu'il pourrait y avoir un biais d'effectifs.

B. LIMITES DE L'ETUDE

Notre étude présente certaines limites :

Les embryons considérés comme « Top » sont constitués par le regroupement des grades A, B et C+, de façon indifférenciée. Nous pourrions affiner les résultats en analysant de façon plus précise ces grades.

Hormis les facteurs « âge de la patiente » et « rang de la tentative », nous n'avons pas pris en compte certains paramètres qui entrent en jeu dans le processus d'implantation embryonnaire et de grossesse évolutive, tels que l'indication de l'infertilité (féminine ou masculine), le statut ovarien de la patiente ainsi que la réceptivité endométriale. Cela pourra être l'objet d'un travail ultérieur.

Pour les embryons « Top », notre étude a mis en évidence des taux de grossesse supérieurs lorsqu'on utilise la stratégie du DET comparé au SET, quel que soit le stade de développement (56% vs 31% pour le stade clivé et 61% vs 47% pour le stade de blastocyste). Cependant les taux d'implantation (VPP) apparaissent identiques (31% vs 36% pour le stade clivé et 47% vs 43% pour le stade de blastocyste). Notre système d'observation morphologique et de gradation des embryons semble être limité du fait d'une mauvaise spécificité, car il y a un nombre élevé de faux positifs (embryons « Top » non implantés), l'augmentation du nombre d'embryons transférés aboutit juste à une augmentation des chances de grossesse dont l'effet délétère est l'augmentation du nombre de grossesses gémellaires.

Ce résultat met en lumière la limite de notre évaluation morphologique de l'embryon.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette limite :

(i) Nous n'avons pas pris en compte certains paramètres impliqués dans le processus d'implantation, comme la réceptivité endométriale, cependant au vu du grand nombre de patientes, et de la pratique du centre il est peu probable qu'un biais puisse exister. En effet, toutes les patientes sont soumises au même rythme du monitorage de l'ovulation avec des conditions de déclenchement identiques, d'autre part les conditions d'annulation de transfert et d'indication de freeze-all sont standardisées en fonction de la progestéronémie et de la mesure de l'épaisseur endométriale.

(ii) Il pourrait exister une variabilité inter-observateur de l'évaluation de la morphologie embryonnaire, ce phénomène a déjà été décrit (*Paternot et al. 2009*). Dans une démarche d'optimisation de nos pratiques, il faut souligner que chaque nouvel arrivant bénéficie d'une formation initiale très stricte, que le laboratoire participe à des évaluation externe de la qualité et que

régulièrement un maintien de la compétence est vérifié concernant l'observation microscopique des embryons. Ce risque semble donc minime.

(iii) Concernant les faux positifs obtenus au stade de blastocyste une culture sub-optimale pourrait en être responsable. En effet, l'environnement dans le laboratoire, les types de milieux de culture et la température influencent la cinétique du développement (*Gardner et al. 2016*). La qualité de la culture prolongée est dépendante du niveau d'équipement du laboratoire d'AMP en incubateurs.

Les incubateurs trigaz (5%O₂, 5%CO₂, 90%N₂) reproduisent les conditions d'hypoxie in utero et permettent un développement embryonnaire optimal jusqu'au stade de blastocyste (*Meintjes et al. 2009*). De plus, certains sont dotés de chambres individuelles, afin de diminuer nettement les variations des conditions de culture : température, lumière et pH, néfastes au développement embryonnaire. Dans notre étude, nous devons reconnaître que les embryons ont été cultivés dans des incubateurs classiques avec un taux d'O₂ avoisinant les 19%. Malgré un coût élevé, l'acquisition de ce type d'incubateur est une piste intéressante pour améliorer les taux de grossesse obtenus en SET blastocyste, ce qui pourrait nous permettre d'améliorer la spécificité de notre méthode.

Concernant le stade clivé, les embryons étant moins sensibles à l'hypoxie, ces incubateurs n'apporteraient pas un bénéfice notable sur le développement et la sélection embryonnaire.

Le système Time-Lapse est un nouvel outil permettant de photographier les embryons à intervalle régulier, et ce tout au long de leur développement, à l'aide d'une caméra intégrée. Cette nouvelle technologie présente plusieurs intérêts (*Kirkegaard et al. 2012* ; *Gardner et al. 2016* ; *Motato et al. 2016*) : Tout d'abord, les images collectées sont enregistrées et consultables à volonté, par différents intervenants, ce qui entraîne une diminution des variations de la description morphologique des embryons. Elle permet ainsi d'obtenir une harmonisation de l'évaluation de la cinétique du développement embryonnaire de façon quasi continue et ce, sans avoir besoin de sortir les embryons des incubateurs, ce qui confèrera des conditions de culture embryonnaire optimisées. En effet, l'observation des embryons au microscope nécessite d'ouvrir les enceintes thermiques de nombreuses fois (J1, Clivage précoce, J2, J3, J5), voire plus si plusieurs boîtes de culture sont déposées dans un même incubateur.

La fragmentation embryonnaire pourrait se résorber au fil du temps, ce qui est impossible à voir lors de la lecture (« one shoot ») quotidienne au microscope et les informations recueillies sur la cinétique de développement peuvent également aider à la sélection embryonnaire. En effet, en plus du temps de clivage des embryons, le délai entre les divisions cellulaires est également important (*Scott et al. 2007* ; *Lemmen et al. 2008* ; *Meseguer et al. 2011* ; *Cruz et al. 2012* ; *reviewed by Kirkegaard et al. 2012* ; *Castello et al. 2016*). En 2016, Petersen et Gardner ont comparé différents algorithmes permettant de prédire les chances de blastulation ou d'implantation en fonction des caractères

morpho-cinétiques observés jusqu'à J3, via Time-Lapse ou via la méthode conventionnelle (*Petersen et al. 2016*). Parmi les différents algorithmes étudiés, le KIDSscore et celui de Liu étaient les 2 plus performants, en terme de prédition de la blastulation, avec des AUC à 0.745 et 0.753 respectivement, ainsi que de la morphologie embryonnaire à J5 (AUC=0.679 et 0.695 respectivement). Il est à noter que seuls ces 2 algorithmes incluant une technique de Time-Lapse sur les 6 évalués, étaient supérieurs en terme de valeur prédictive, comparativement à l'évaluation conventionnelle, basée sur le Consensus de l'ESHRE.

Du fait de la possibilité de prédire de manière fiable la survenue de la blastulation, cette technologie nous permet également de sélectionner l'embryon à transférer à J3 pour éviter les risques dus à une exposition prolongée aux milieux de culture in vitro.

Ces nouveaux systèmes présentent néanmoins certaines limites. Ils nécessitent une gestion de mémoire adaptée et importante et une augmentation du temps d'observation des enregistrements : l'équilibre doit être trouvé entre le bénéfice apporté par cette analyse et le temps passé à la gestion des enregistrements. Certaines études ne montrent pas de différence significative avec les incubateurs standards (notamment à J2, *Park et al. 2015*). Enfin il s'agit d'un investissement financier important, encore inaccessible pour la plupart des centres d'AMP.

(iv) La dernière hypothèse que l'on pourrait avancer pour expliquer la présence de faux positifs indétectables par la méthode que nous utilisons est l'existence d'aneuploïdies. Même si au stade de blastocyste le taux d'aneuploïdie est supposé être moindre qu'au stade clivé, il persiste tout de même parmi les blastocystes « Top », 40% d'entre eux qui sont aneuploïdes (*Franasiak et al, 2014*). La plupart des chromosomes impliqués dans les aneuploïdies étaient les chromosomes 13, 15, 16, 18, 19, 21, et 22 ($p < 10^{-6}$, RR1.8). Ce qui est important à souligner, car ces anomalies n'entraînent pas seulement des échecs d'implantation, mais peuvent également conduire à des grossesses pathologiques (*Franasiak et al. 2014*).

Afin de pallier à ce problème, de nouvelles technologies sont mises en place, notamment grâce au dépistage des anomalies chromosomiques post biopsie du trophectoderme en utilisant des techniques de PCR, CGH array ou NGS.

En 2013, une étude randomisée a comparé les taux de grossesse évolutive entre les transferts d'un seul blastocyste biopsié et évalué comme euploïde, versus 2 blastocystes non biopsiés (*Foreman et al. 2013*). Elle a mis en évidence un taux de grossesse évolutive équivalent entre les 2 stratégies (60% en SET biopsié, versus 67% en DET non biopsiés), cependant aucune grossesse gémellaire n'a été recensée après transfert d'un seul embryon, alors qu'il y en a eu 53% après transfert de 2 embryons ($p < 0.01$). Cette technique est prometteuse dans l'évolution vers la stratégie du SET blastocyste, or il s'agit d'une technologie coûteuse et encore interdite en France.

C. UTILITE DE L'ETUDE

Notre étude a permis de mettre à jour les résultats obtenus dans le service de Biologie de la Reproduction de l'Hôpital Antoine Béclère.

Nous pouvons ainsi donner une information actualisée sur les chances réelles de succès aux cliniciens et aux patients, et améliorer la discussion clinico-biologique lors de l'inclusion des couples en AMP et au cours de leur tentative.

Plusieurs paramètres entrent en jeu dans le choix de la politique de transfert : avant la tentative, il est nécessaire de connaître les antécédents gynéco-obstétriques de la patiente et les antécédents du couple s'ils ont déjà eu un parcours en AMP ; puis au cours de la tentative, la stratégie de transfert se précisera en fonction de la cohorte embryonnaire obtenue. L'avantage du SET blastocyste en présence d'embryons « Top » a été démontré, cependant lorsqu'il n'y a que des embryons de bas grade, il est important d'informer le couple des différentes stratégies possibles. La question du DET clivé versus une culture prolongée est à discuter avec le clinicien et le couple, en fonction du nombre d'embryons disponibles, de leur morphologie et du souhait des patients vis-à-vis des risques de grossesses gémellaires.

L'équipe médicale a de ce fait été sensibilisée sur les taux de grossesse gémellaire importants obtenus lors des transferts de 2 embryons, ce qui a permis d'orienter les cliniciens et biologistes vers une stratégie de transfert d'un seul embryon dès que les conditions le permettent.

Nous avons également pu constater que le choix de transférer 3 embryons simultanément restait assez rare, et était en diminution constante, notamment chez les patientes jeunes et lors des premières tentatives. Cela confirme la volonté de l'équipe médicale de réduire considérablement les risques fœto-maternels dus aux grossesses multiples.

D'autre part, les résultats obtenus pour les embryons « Non Top » viennent confirmer leur capacité à se développer et donner des naissances vivantes, malgré une morphologie de bas grade, ce qui avait déjà été souligné dans une étude réalisée dans le service. De plus, cette précédente étude n'avait pas mis en évidence de différence dans les critères morphologiques, concernant la capacité des embryons « Non Top » à évoluer en blastocystes de haut ou de bas grade (*Poulain et al. 2014*), d'où la possibilité d'obtenir des blastocystes « Top » et d'éviter les transferts de 2 embryons.

PARTIE VI : CONCLUSION

Depuis le début du développement de la Fécondation In Vitro, de nombreuses études ont été menées concernant la culture embryonnaire afin de trouver la stratégie de transfert idéale.

Le transfert au stade blastocyste s'est développé de par l'optimisation des milieux de culture, et de la technique de vitrification, permettant ainsi d'augmenter les taux de succès en AMP, ainsi que les transferts d'embryon unique.

La question de la culture prolongée pour tous se pose aujourd'hui, du fait des meilleurs taux de grossesse obtenus par rapport à un transfert au stade clivé, cependant quelques paramètres viennent à l'encontre de cette stratégie (augmentation du taux de prématurés, du sexe-ratio homme-femme, du poids de naissance ou d'absence de transfert).

Notre étude a permis de mettre à jour les données du service de l'Hôpital Antoine Béclère et de proposer une optimisation de la politique de transfert en conséquence.

Ainsi, pour les embryons de haut grade, elle vient confirmer l'étude préliminaire qui avait mis en évidence la supériorité de la culture prolongée en SET. En DET, contrairement à l'étude de 2013, la VPP est également supérieure à J5, cependant du fait d'une augmentation du taux de FCS on aboutit à un taux d'accouchement équivalent entre les 2 stades de développement, associé à un risque de grossesse gémellaire plus important. C'est pourquoi le transfert au stade clivé en DET serait à privilégier.

Concernant les embryons de bas grade, nous avons confirmé l'étude préliminaire car aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les transferts aux stades clivé et blastocyste. Cependant leur potentiel évolutif et leur capacité à donner des naissances vivantes peuvent une fois de plus être soulignés.

Cette étude sera approfondie en prenant en compte différents paramètres qui entrent en jeu dans le processus d'implantation : bilan de réserve ovarienne, indication de l'infertilité, réceptivité endométriale ; mais également en s'intéressant de plus près aux taux cumulés de grossesse après transferts frais et congelés dans notre service.

La sélection de l'embryon ayant le meilleur potentiel implantatoire reste le challenge ultime de l'AMP. L'évolution constante des nouvelles technologies, telles que les incubateurs trigaz et les systèmes Time-Lapse, permet d'optimiser toujours plus les conditions de culture embryonnaire en

favorisant la stabilité de l'environnement in vitro, mais cela implique un investissement financier important qui n'est pas encore à la portée de tous les services d'AMP.

Du fait des limites de l'observation morphologique sur l'évaluation du potentiel implantatoire embryonnaire, d'autres pistes se développent, telles que la génération des « OMICS » (chromosomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique) et devraient permettre l'identification d'indicateurs pertinents et fiables du potentiel embryonnaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agence de la Biomédecine. Rapport annuel médical et scientifique de l'activité d'Aide Médicale à la Procréation, 2015.

Alpha Scientists In Reproductive Medicine, ESHRE Special Interest Group Embryology, 2011. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction* 2011;Vol.26, No.6 pp. 1270–1283. doi:10.1093/humrep/der037.

Boyer P, Guichard A, Risquez F, Perez J, Mathieson J, Zorn JR. The risk of multiple pregnancies by coculture of human embryo. *J In Vitro Fertil* 1990;7:86.

Boyer P, Mercier G, Boyer M. Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. Morphologie de l'embryon humain : évaluation et corrélation à son potentiel de développement. France : Springer 2011, 491-505P.

Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988;332(6163):459-61.

Brown J, Daya S, Matson P. Day three versus day two embryo transfer following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016, Issue 12. Art. No.: CD004378. DOI: 10.1002/14651858.CD004378.pub3.

Chang HJ, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Impact of blastocyst transfer on offspring sex ratio and the monozygotic twinning rate: a systematic review and meta-analysis. *Fertility Sterility* 2009 Jun;91, 2381–2390.

Check JH, O'Shaughnessy A, Lurie D, Fisher C, Adelson HG. Evaluation of the mechanism for higher pregnancy rates in donor oocyte recipients by comparison of fresh with frozen embryo transfer pregnancy rates in a shared oocyte programme. *Human Reproduction* 1995 Nov;10(11):3022-7.

Castelló D, Motato Y, Basile N, Remohí J, Espejo-Catena M, Meseguer M. How much have we learned from time-lapse in clinical IVF? *Molecular Human Reproduction* 2016 Oct;22(10):719-727.

Cruz M, Garrido N, Herrero J, Perez-Cano I, Munoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reproductive BioMedicine Online* 2012;25:371–381.

De Ziegler D, Bulletti C, Fanchin R, Epiney M, Brioschi PA. Contractility of the nonpregnant uterus: the follicular phase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001;943, 172–184.

Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Polz W, Tews G. Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertility Sterility* 2001;76:281-285.

Fanchin R, Ayoubi JM, Righini C, Olivennes F, Schönauer LM, Frydman R. Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. *Human Reproduction* 2001 Jun;16(6):1115-9.

Fauque P, Léandri R, Merlet F, Juillard JC, Epelboin S, Guibert J, Jouannet P, Patrat C. Pregnancy outcome and live birth after IVF and ICSI according to embryo quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2007 May; 24(5): 159–165. doi: 10.1007/s10815-007-9115-z

Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Wells D. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Mol. Human Reproduction* 2014;20, 117–126. doi:10.1093/molehr/gat073.

Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT. Aneuploidy across individual chromosomes at the embryonic level in trophectoderm biopsies: changes with patient age and chromosome structure. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2014;31(11):1501-1509. doi:10.1007/s10815-014-0333-x.

Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil. Steril.* 1998;69, 84–88.

Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocysts. In: Jansen R, Mortimer D (eds). *Toward Reproductive Certainty: Infertility and Genetics Beyond* 1998;378–388.

Gardner DK, Balaban B. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and OMICS: is looking good still important? *Mol Human Reproduction* 2016;Vol.22, No.10 pp. 704–718.

Glujovsky D, Farquhar C, Quinteiro Retamar AM, Alvarez Sedo CR, Blake D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016;Issue 6. Art. No.: CD002118. doi: 10.1002/14651858.CD002118.pub5.

Guerif F, Lemseffer M, Bidault R, Gasnier O, Saussereau MH, Cadoret V, Jamet C, Royere D. Single Day 2 embryo versus blastocyst-stage transfer: a prospective study integrating fresh and frozen embryo transfers. *Human Reproduction* 2009 May;24(5):1051-8. doi: 10.1093/humrep/dep018.

Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Human Reproduction* 2001;16:313–318.

Hardarson T, Caisander G, Sjögren A, Hanson C, Hamberger L, Lundin K. A morphological and chromosomal study of blastocyst developing from morphologically suboptimal human pre-embryos compared with control blastocysts. *Human Reproduction* 2003;Volume 18, 2003, Pages 399-407.

Hardarson T, Van Landuyt L and Jones G. The blastocyst. *Human Reproduction* 2012;Vol.27, No.S1 pp. i72–i91, 2012. doi:10.1093/humrep/des230.

Holte J, Berglund L, Milton K, Garello C, Gennarelli G, Revelli A, Bergh T. Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. *Human Reproduction* 2007;22:548–557.

Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment, *Human Reproduction* 2012;Volume 27, Issue 5, 1 May 2012, Pages 1277-1285, <https://doi.org/10.1093/humrep/des079>.

Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, Osmanagaoglu K, Smitz J, Van Steirteghem A, Devroey P. Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertility Sterility* 2002;78, 1025-1029.

Laverge H, De Sutter P, Van der Elst J, Dhont M. A prospective, randomized study comparing day 2 and day 3 embryo transfer in human IVF. *Human Reproduction* 2001 Mar;16(3):476-80.

Lee JW, Cha JH, Shin SH, Kim YJ, Lee SK, Park CK, Pak KA, Yoon JS, Park SY. Efficacy of embryo transfer on day 2 versus day 3 according to maternal age in patients with normal ovarian response. *Clinical and Experimental Reproductive Medicin*. 2017 Sep;44(3):141-145.

Lemmen, J, Agerholm IE, & Ziebe, S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reproductive BioMedicine online* 2008; 17 3, 385-91.

Lukassen HG, Braat DD, Wetzels AM, Zielhuis GA, Adang EM, Scheenjes E and Kremer JA. Two cycles with single embryo transfer versus one cycle with double embryo transfer : a randomized controlled trial. *Human Reproduction* 2005 Mar ;20(3) :702-8.

Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP. Chromosomal abnormalities in embryos. *Mol Cell Endocrinol* 2001;183:29-34.

Maheshwari A, Hamilton M, Bhattacharya S. Should we be promoting embryo transfer at blastocyst stage? *Reproductive BioMedicine Online* 2016;32, 142-146.

Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, Barnett BD, Madden JD. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Human Reproduction* 2009;Volume 24, Issue 2, Pages 300-307. <https://doi.org/10.1093/humrep/den368>

Meseguer M1, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human Reproduction Oxf Engl*. Oct 2011;26(10):2658-71. doi:10.1093/humrep/der256.

Milki AA, Jun SH, Hinckley MD, Behr B, Giudice LC, Westphal LM. Incidence of monozygotic twinning with blastocyst transfer compared to cleavage-stage transfer. *Fertility Sterility* 2003 Mar;79(3):503-6.

Motato Y, Castelló D, Basile N, Remohí J, Espejo-Catena M, Meseguer M, 2016. How much have we learned from time-lapse in clinical IVF? *Mol Human Reproduction*, 2016;Volume 22, Issue 10, Pages 719-727.

Munné S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reproduction Biomedicine Online* 2006;12:234-253.

National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE). Fertility – assessment and treatment for people with fertility problems. NICE Clin Guide 2013;156.

Pandian Z, Marjoribanks J, Ozturk O, Serour G, Bhattacharya S. Number of embryos for transfer following in vitro fertilization or intra-cytoplasmic sperm injection. Cochrane Database of Systematic Review 2013; Issue 7. Art No.:CD003416.

Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, Devroey P, 2006. In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. New England Journal of Medicine 2006 Mar 16;354(11):1139-46.

Park H, Bergh C, Selleskog U, Thurin-Kjellberg A, Lundin K. No benefit of culturing embryos in a closed system compared with a conventional incubator in terms of number of good quality embryos: results from an RCT. Human Reproduction 2015; Volume 30, Issue 2, Pages 268–275. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu316>

Paternot G, Devroe J, Debrock S, D'Hooghe TM, Spiessens C. Intra- and inter-observer analysis in the morphological assessment of early-stage embryos. Reprod Biol Endocrinol RBE. 2009;7:105.

Petersen BM, Boel M, Montag M, Gardner DK. Development of a generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on Day 3. Human Reproduction 2016 ; Volume 31, Issue 10, Pages 2231–2244. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew188>

Poulain M, Hesters L, Sanglier T, de Bantel A, Fanchin R, Frydman N, Grynberg M, 2014. Is it acceptable to destroy or include human embryos before day 5 in research programmes? Reproductive Biomedicine Online 2014;28, 522–529. doi:10.1016/j.rbmo.2013.12.007.

Prados J, Debrock S, Lemmen J and Agerholm I. The cleavage stage embryo. Human Reproduction, 2012;Vol.27, No.S1 pp. i50–i71. doi:10.1093/humrep/des224.

Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E, Greco E. Significance of morphological attributes of the early embryo. Reproductive Biomedicine Online. 2005 May;10(5):669-81.

Scott L, Finn A, O'Leary T, McLellan S, Hill J. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. Human Reproduction 2007;22:230–240.

Sermondade N, Delarouzière V, Ravel C, Berthaut I, Verstraete L, Mathieu E, Antoine JM, Mandelbaum J. Characterization of a recurrent poorquality embryo morphology phenotype and zygote transfer as a rescue strategy. Reproduction Biomedicine Online 2012;24, 403–409. doi:10.1016/j.rbmo.2012.01.004

Shaw-Jackson C, Bertrand E, Becker B, Colin J, Beaudoin-Chabot C, Rozenberg S, Autin C. Vitrification of blastocysts derived from fair to poor quality cleavage stage embryo can produce high pregnancy rates after warming. Journal of Assistance Reproduction and Genetic 2013;Volume 30, Pages 1035-1042.

Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation

genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Human Reproduction* 2004 Dec;19(12):2849-58.

Valbuena D, Martin J, de Pablo JL, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. *Fertility Sterility* 2001;76, 962-968.

Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer, *Human Reproduction* 1999;Volume 14, Issue 9, Pages 2345-2349. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.9.2345>.

Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G, Gerris J. Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. *Human Reproduction* 2001;16:326-332.

Wang X, Du M, Guan Y, Wang B, Zhang J, Liu Z. Comparative neonatal outcomes in singleton births from blastocyst transfers or cleavage-stage embryo transfers: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2017 May 4;15(1):36.

Wang YA, Costello M, Chapman M, Black D, Sullivan EA. Transfers of fresh blastocysts and blastocysts cultured from thawed cleavage embryos are associated with fewer miscarriages. *Reproductive BioMedicine Online* 2011;Volume 23 , Issue 6 , 777 – 788.

Zech NH, Lejeune B, Puissant F, Vanderzwalmen S, Zech H, Vanderzwalmen P. Prospective evaluation of the optimal time for selecting a single embryo for transfer: day 3 versus day 5. *Fertility Sterility* 2007 Jul;88(1):244-6.

Ziebe S, Lundin K, Loft A, Bergh C, Nyboe Andersen A, Selleskog U, Nielsen D, Grøndahl C, Kim H, Arce JC; for the CEMAS II and III Study Group. FISH analysis for chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X and Y in all blastomeres of IVF pre-embryos from 144 randomly selected donated human oocytes and impact on pre-embryo morphology. *Human Reproduction* 2003;18:2575-2581.

SERMENT DE GALIEN

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

- ❖ *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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