

Collège sciences et technologies pour l'énergie et l'environnement de la Côte Basque
Université de Pau et des Pays de l'Adour
Licence Biologie des organismes



**CENTRE
DE FERTILITÉ**



Etude comparative de deux paramètres influençant la qualité embryonnaire

DOUSSET CAROLINE

Stage effectué du 12 mars 2018 au 4 mai 2018 au centre de fertilité de La
Rochelle sous la direction scientifique de Monsieur Olivier Moreau

*« Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la
responsabilité du laboratoire d'accueil »*

Résumé

Dans ce présent rapport scientifique, il sera question d'exposer les démarches suivies permettant d'étudier deux paramètres essentiels du développement embryonnaire lors des procédures de PMA (procréation médicalement assistée). En effet, les étapes préliminaires pour la réalisation d'une FIV (fécondation in vitro) ou d'une ICSI (fécondation in vitro assistée) ont pour but d'obtenir un embryon. Au cours de la première semaine suivant la fécondation, l'embryon va se développer en conditions in vitro. Pour assurer un bon développement et un embryon de qualité suffisante pour prévoir un transfert intra utérin, deux facteurs principaux vont entrer en jeu : le milieu de culture et l'incubateur. Ces deux éléments ont pour objectif de reproduire le plus exactement possible les conditions de vie intra utérine. L'embryon est déposé dans une microgoutte du milieu de culture puis incubé dans l'incubateur durant au minimum les trois premiers jours de son existence. C'est donc une étape cruciale afin d'espérer la réussite de la procédure de PMA.

Le milieu de culture va constituer la réserve de nutriments pour l'embryon. L'incubateur va avoir pour rôle principal le maintien de la température du milieu ainsi que la composition en gaz de l'environnement atmosphérique.

Tous les deux participent activement à la stabilité des conditions nécessaires à la survie embryonnaire.

Il est donc extrêmement important d'avoir un milieu et un incubateur de qualité répondant rigoureusement aux attentes précises de l'embryon.

L'ensemble des données et des informations récoltées et étudiées sont issues du centre de fertilité de La Rochelle. Effectivement, le centre connaît depuis quelques mois une diminution du taux de réussite, de nombreuses raisons peuvent être en cause, mais nous allons ici étudier la piste des incubateurs et des milieux de culture. Ce rapport contient donc une étude comparative de deux types d'incubateurs et de deux milieux de culture différents. Il s'agit d'évaluer leurs performances et leur efficacité respectives en considérant la qualité embryonnaire et les taux de grossesses obtenus.

Mots clés :

- Embryon
- PMA : procréation médicalement assistée
- ICSI : Injection intracytoplasmique
- FIV : Fécondation in vitro
- Incubateur
- Milieu de culture
- Ovocytes
- Spermatozoïdes
- Classification de Blefco

Avant-propos

Les laboratoires BIO 17 sont nés en 1973 à l'initiative du biologiste Monsieur Jean Ferru sous le nom de laboratoire FERRU. Au fil des années, des associations de biologistes se sont succédées : M. Clerc, M. Przyrowski, M. Filliol et M. Moreau. De 2003 à 2014, de nombreux laboratoires ont fusionnés créant ainsi le groupe BIO 17 qui concentre désormais 11 laboratoires. L'effectif global est de 152 employés regroupant des biologistes médicaux, un directeur des ressources humaines, des qualitatifs, des comptables, des secrétaires, des infirmiers, des techniciens de laboratoire, des agents d'entretien et des coursiers avec une moyenne de 2000 dossiers traités par jour.

Les activités principales de BIO 17 sont les analyses de biologie médicale et l'assistance médicale à la procréation (AMP).

Les missions sont bien définies :

- Accueil des patients
- Réalisation des prélèvements
- Exécution des analyses avec fiabilité et exactitude
- Validation technique et biologique des examens
- Interprétation des résultats
- Transmission des résultats aux patients et aux prescripteurs
- Prestation de conseil destinée aux patients

La structure est concernée par une politique de qualité très rigoureuse avec notamment une part d'éthique et des objectifs qualités à respecter.

Le lieu de l'étude se trouve sur le littoral atlantique, il s'agit du Centre de Fertilité BIO 17 de La Rochelle à la Clinique du Mail. Ce centre a été créé il y a 17 ans par le biologiste Olivier Moreau, c'est donc un institut récent et moderne. Au laboratoire, l'ensemble des manipulations a pour objectif de donner la vie et de permettre aux couples d'assurer leur lignée malgré l'infertilité.

En moyenne, le centre de La Rochelle effectue 500 à 600 tentatives de PMA par an grâce à une équipe de deux biologistes, trois techniciennes de laboratoire, trois gynécologues cliniciens, deux secrétaires et deux infirmières. L'équipe se relaie chaque jour du lundi au dimanche afin de veiller sur les embryons.

Toujours à la recherche de techniques innovantes et d'améliorer les taux de réussite, le laboratoire, l'équipe du Centre de Fertilité La Rochelle est spécifiquement formée à la prise en charge de l'infertilité et développe depuis de nombreuses années un savoir-faire d'excellence allié à des outils technologiques de pointe. Le centre est classé parmi les meilleurs centres français grâce à un excellent taux de réussite, c'est une structure privée à taille humaine ce qui permet à l'équipe de proposer une prise en charge personnalisée dans un environnement chaleureux et familial.



Figure 1 : Laboratoire de PMA Bio 17

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Monsieur Moreau, qui a été le moteur de mon présent rapport et un soutien inconditionnel. Par sa sympathie et ses bons conseils, ce fut pour moi une réelle chance de le rencontrer et je lui exprime toute ma gratitude pour m'avoir intégré au sein du laboratoire.

Je remercie aussi sa collègue biologiste, Madame Gaildraud, pour sa gentillesse et sa collaboration concernant les données statistiques.

Je porte une attention toute particulière aux techniciennes de laboratoires, Cécile, Gladys et Nassima, avec qui j'aurais passé le plus de temps et qui m'ont transmis de nombreuses connaissances pratiques. Je les remercie pour leur sympathie, leur amabilité et pour l'accueil qu'elles m'ont réservé.

Merci aussi à l'équipe de cliniciens, Monsieur Proust, Madame Legrand et Madame Mercadet, ainsi qu'aux secrétaires Céline et Emilie pour les bons moments passés.



Table des matières

RESUME	2
AVANT-PROPOS	3
REMERCIEMENTS.....	4
<u>INTRODUCTION</u>	<u>1</u>
<u>CONTEXTUALISATION ET RAPPELS.....</u>	<u>2</u>
<u>MATERIELS ET METHODES</u>	<u>7</u>
ETUDE 1 : LES MILIEUX DE CULTURE	7
ETUDE 2 : LES INCUBATEURS.....	10
METHODES STATISTIQUES UTILISEES.....	11
<u>RESULTATS</u>	<u>12</u>
ETUDE 1 : LES MILIEUX DE CULTURE	12
ETUDE 2 : LES INCUBATEURS	13
.....	13
<u>DISCUSSION</u>	<u>15</u>
ETUDE 1 : LES MILIEUX DE CULTURE	15
ETUDE 2 : LES INCUBATEURS.....	15
CORRELATION ET ANALYSE DES ETUDES MENEES	16
<u>CONCLUSION</u>	<u>17</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>19</u>

Introduction

L'espèce humaine est de nature peu fertile, et actuellement 15% des couples consultent pour problème de procréation. Les couples possèdent de plus en plus de difficultés pour procréer et de nouvelles techniques sont apparues permettant de proposer des solutions pour assurer la poursuite de leur lignée.

Les scientifiques et les médecins ont pour objectif d'acquérir le processus naturel de reproduction, cela passe par une maîtrise des mécanismes cellulaires tels que la maturation gamétique, la fécondation et le développement embryonnaire pré-implantatoire.

Les interventions lors d'une procréation médicalement assistée¹ sont plus ou moins complexes, en effet, cela va de l'IIU² à l'ICSI en passant par la FIV. La pratique utilisée dépend de la pathologie identifiée responsable de l'infertilité. Il y a donc une grande variabilité des techniques employées mais aussi des risques. L'ensemble de ces méthodes nécessitent des outils et des produits très spécifiques.

La culture embryonnaire est une étape cruciale du protocole, elle est caractérisée par deux paramètres primordiaux : le milieu de culture et l'incubateur. Les incubateurs et le réactif représentent les lieux où vont se développer les embryons à partir de la fécondation jusqu'au transfert, c'est donc dans ces milieux incubés que l'embryon va passer le plus de temps, d'où leurs rôles incontournables lors d'une procédure de PMA. Le challenge est de représenter dans ces outils le plus justement possible, les conditions de vie intra-utérine avec une régulation fine des paramètres environnementaux. Sur le marché, de nombreux incubateurs et milieux de culture avec des caractéristiques et des coûts différents sont présents. Il appartient donc au biologiste de faire un choix afin d'assurer les meilleurs taux de grossesses. Dans ce rapport, il s'agit de réaliser une étude comparative entre deux milieux de culture et deux incubateurs afin de savoir lesquels représentent au mieux les conditions de vie intra-utérine pour assurer les meilleurs taux de réussite et donc de guider les choix du biologiste.

L'embryon est déposé pour sa culture dans des microgouttes de réactif qui ont pour objectif d'alimenter en nutriments l'embryon et de constituer sa zone de culture. Le choix d'un milieu de culture présente donc un intérêt particulier pour le taux de succès de la FIV. Néanmoins, il n'existe pas de consensus dans la littérature en ce qui concerne l'utilisation de milieux séquentiels ou unique. Pour les premiers, l'idée est d'apporter à l'embryon au quotidien « ses » besoins, pour les seconds, l'embryon s'adapte à son environnement. De plus, de nombreux milieux sont disponibles sur le marché, il faut donc choisir lequel correspond à la fois au budget et aux objectifs du laboratoire. L'objectif de la première étude a été d'évaluer deux milieux (uniques) de culture globaux commerciaux (Global® Life-Global et le GAIN) en étudiant leur influence sur la qualité embryonnaire

¹ PMA

² Insémination intra-utérine

D'autre part, l'embryon passera la première semaine de son existence dans un incubateur. Celui-ci joue un rôle essentiel, effectivement, il va conditionner l'environnement atmosphérique de l'embryon, en essayant de se rapprocher au maximum des conditions intra-utérine. L'incubateur va réguler les concentrations en gaz notamment en O₂, CO₂ et N et donc agit directement sur le pH du milieu et sur les conditions d'incubation.

Au centre de fertilité de La Rochelle, un nouvel incubateur est arrivé en décembre 2017, il complète les anciens modèles. Il est issu d'une firme japonaise et seulement trois centres en France l'utilisent. Il s'agit de l'incubateur Astec IVF cube. Donc depuis quelques temps, deux types d'incubateurs sont en route et participent activement aux résultats du laboratoire. Il s'agit dans cette seconde étude de comparer les deux outils afin de déterminer si l'un ou l'autre est plus efficace et donne de meilleurs taux de grossesses.

L'objectif de ce rapport est de comparer les deux milieux de culture et les deux modèles d'incubateur utilisés par l'équipe du centre à La Rochelle. Nous analyserons les taux de réussite caractérisés par la qualité embryonnaire, les taux de grossesses cliniques et les taux de grossesses vivantes.

Quel incubateur et quel milieu de culture permettrait d'assurer une meilleure qualité embryonnaire et donc de meilleurs taux de grossesse ?

Depuis quelques mois, le centre de PMA de La Rochelle connaît une diminution du nombre de tentatives et du nombre de grossesses cliniques. Dans ce contexte inquiétant, de nombreux acteurs peuvent être responsables de cette décroissance. Ce rapport attache de l'importance à l'aspect biologique et s'intéresse aux possibles responsabilités des milieux de culture et/ou des incubateurs. Répondre à cette problématique permettrait d'anticiper et d'analyser ces nouveaux outils biotechnologiques qui représentent de réels enjeux économiques et biologiques.

Contextualisation et rappels

Pour mieux comprendre, l'importance d'un incubateur et du milieu de culture il est absolument nécessaire de faire un rappel sur la biologie de la reproduction et un point concernant les besoins embryonnaires.

La fécondation correspond à la fusion de deux gamètes à 23 chromosomes : l'ovocyte et le spermatozoïde aboutissant à la formation d'un zygote puis d'un embryon à 46 chromosomes. L'embryon va se développer tout en migrant dans l'utérus de la femme. Il passera d'un stade à 2 cellules (blastomères) au stade de blastocyste. La fécondation in vitro permet de « sélectionner » les spermatozoïdes et les ovocytes de meilleure qualité afin d'augmenter les chances de fécondation.



Figure 2 : Schéma rappel de la fécondation

Le protocole démarre forcément par les étapes classiques de PMA. Tout d'abord, afin d'avoir recours aux techniques de PMA, le couple hétérosexuel doit remplir plusieurs critères bien définis. Un rendez-vous avec un gynécologue est programmé afin de déterminer la cause de l'incapacité à avoir un enfant. Les causes d'infertilité sont variées, elles peuvent venir de l'homme, de la femme ou bien des deux.

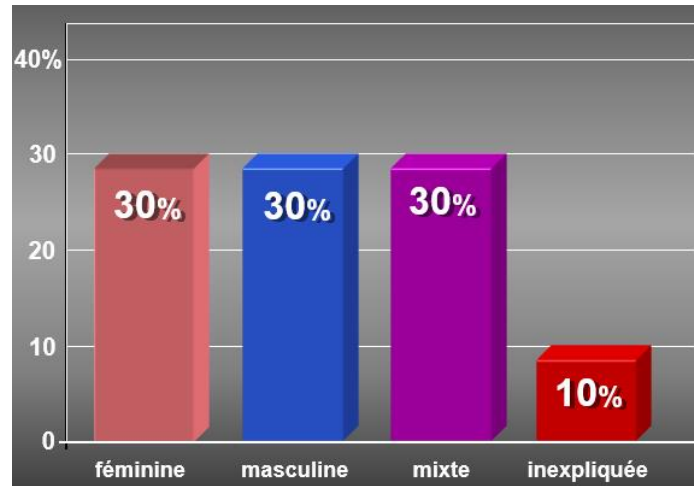


Figure 3 : Répartition des causes d'infertilité suivant différentes caractéristiques

La gravité des pathologies diffère beaucoup, cela peut aller d'une mauvaise qualité du sperme, jusqu'à une endométriose prononcée. Suivant ce diagnostic, le biologiste établira un protocole et déterminera la technique de PMA utilisée et la plus adaptée au couple. Il faut savoir que souvent on commence par une technique simple qui se complexifiera en cas d'échec. Ce sont les étapes préliminaires. C'est donc souvent par une fécondation in vitro classique que les tentatives commenceront. Si c'est un échec alors le biologiste opte pour une FIV ICSI. Pour le couple il n'y a aucune différence de traitement entre une fécondation in vitro conventionnelle et une fécondation in vitro avec micro-injection (ICSI). La différence se situe seulement au niveau de la technique utilisée : choisir un spermatozoïde et l'injecter dans le cytoplasme de l'ovocyte à un endroit bien précis pour induire le processus de fécondation.

Jour 0

L'étape qui suit est le recueil du sperme, il a lieu dans une salle dédiée à la clinique, le même jour que la ponction. Suivant le cas, il peut être recueilli via une éjaculation ou bien une biopsie testiculaire. Le sperme sera donc récupéré au laboratoire afin d'être traité avant la fécondation.

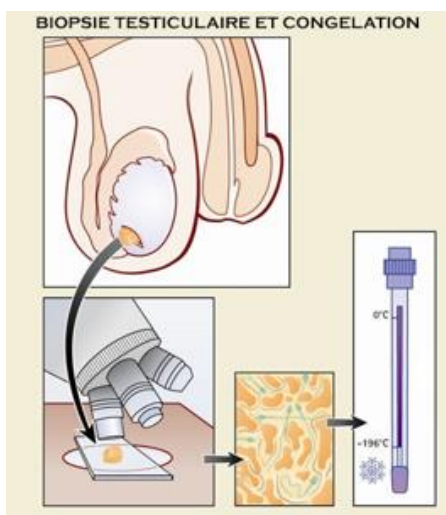


Figure 4 : Schéma de la technique de biopsie testiculaire



Figure 5 : Recueil par éjaculation

Pour cela, plusieurs réactifs sont utilisés et vont permettre de classer le sperme suivant le critère de mobilité, de morphologie, de quantité et de volume.

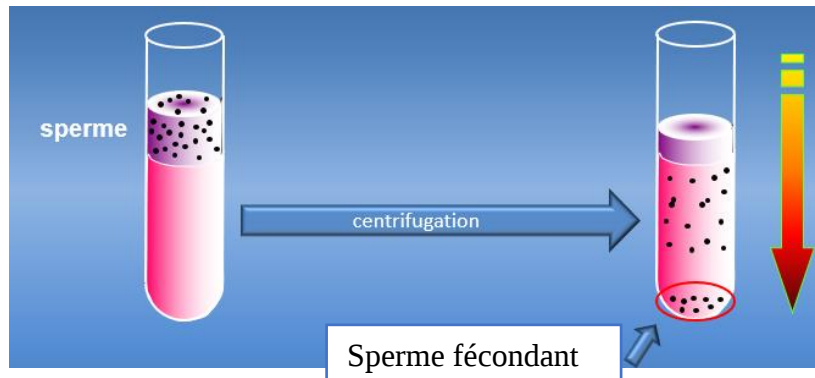


Figure 6 : Technique de traitement de sperme via un gradient de concentration

En parallèles, les ovocytes vont être ponctionnés. Pour cela, la femme est soumise à un traitement médicamenteux et à plusieurs échographies afin de stimuler la croissance folliculaire. Le liquide des follicules où vont se trouver les ovocytes est ponctionné au bloc opératoire sous anesthésie générale. Les seringues recueillies au laboratoire sont minutieusement scrutées et les ovocytes sont récupérés. Le nombre varie suivant la réaction au traitement par l'organisme de la femme. Le risque majeur est une hyperstimulation : la femme réagit trop, le nombre d'ovocyte est extrêmement important et cela peut lui causer des soucis de santé qui empêcheront le futur transfert de l'embryon.

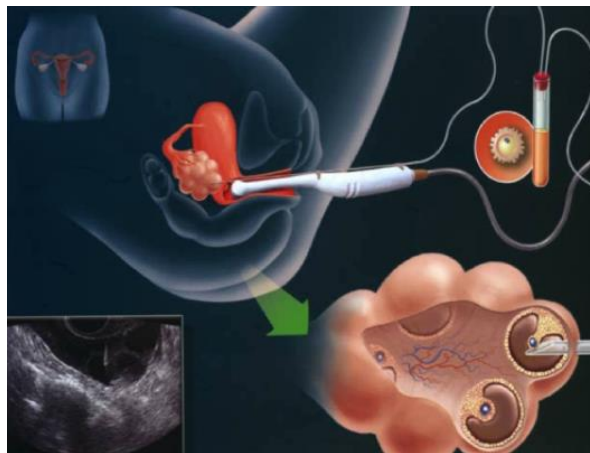


Figure 7 : Illustration de la ponction ovocytaire

Dans le cas d'une FIV les ovocytes seront laissés tels quels dans leur boîte de culture. La fécondation se fera naturellement dans la boîte de culture. Pour cela, autour de chaque ovocyte est déposé environ 200 000 spermatozoïdes.

Pour que la fécondation puisse avoir lieu, il faut que l'une des gamètes mâles parvienne à franchir les enveloppes naturelles qui entourent et protègent l'intérieur de l'ovocyte, soit essentiellement la zone pellucide et la membrane plasmique. Les futurs embryons seront ensuite placés dans l'incubateur toute la nuit pour laisser faire la fécondation.

Pour les ICSI, il y a une étape de décoronisation afin d'éliminer la corona radiata, grâce à une enzyme : la hyaluronidase, on va retirer les débris et les cellules afin de conserver un ovocyte nu pour la micro injection.

Cette micro-injection est faite sous un microscope extrêmement puissant avec deux dispositifs de grande précision (micromanipulateurs). Ceux-ci sont en connexion avec deux microscopiques aiguilles de verres (micropipettes) qui retranscrivent les mouvements à l'échelle de la cellule. Le premier micromanipulateur relie une pipette de contention qui a pour rôle de maintenir (par aspiration) l'ovocyte pendant l'injection. Le second relie une pipette d'injection qui immobilise le spermatozoïde en détruisant son flagelle puis elle l'aspire et l'injecte à l'intérieur de l'ovocyte, le plus délicatement possible.

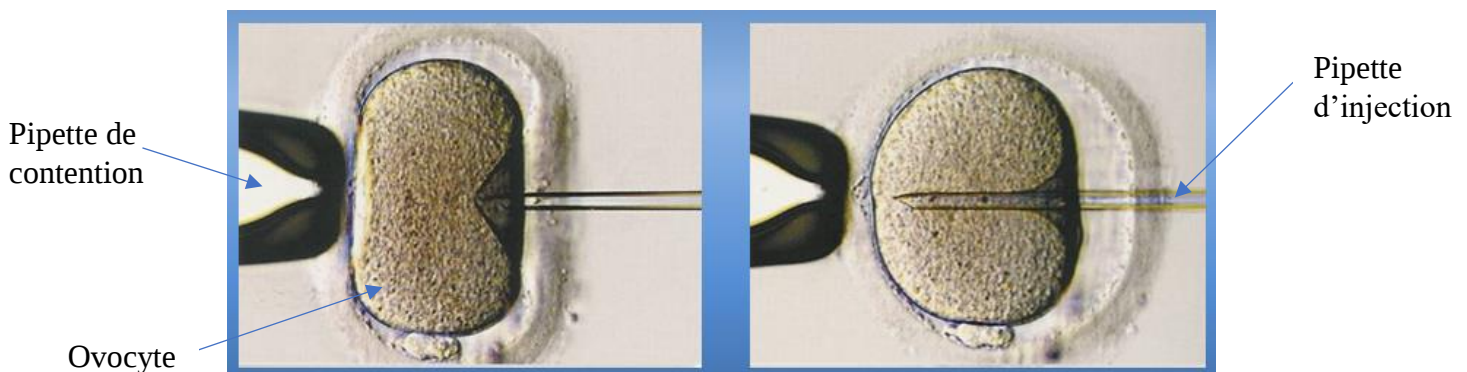


Figure 8 : La micro-injection

Jour 1

Le lendemain matin tous les ovocytes inséminés font l'objet d'un examen individuel attentif afin de voir si la fécondation a eu lieu. Cela se traduit par le nombre de noyaux plurinucléés et de groupements polaires.

Jours 2, 3, 4, 5

Après ces nombreuses étapes, l'embryon va donc être mis en culture et des lectures quotidiennes jusqu'au jour du transfert auront lieu afin de suivre la qualité embryonnaire et donc de choisir l'embryon à transférer. La culture se pratique en milieux spécifiques dans des boîtes stériles placées dans des incubateurs qui imitent les conditions de vie à l'intérieur de l'utérus humain.

Les conditions de culture des gamètes et des embryons sont asservies à des impératifs appelés l'homéostasie mais aussi à l'air, la qualité des milieux de culture et à l'absence de stress. Un embryon pour se développer a des besoins moléculaires et environnementaux très précis. Tout d'abord, deux étapes se distinguent : la fécondation et le développement embryonnaire. Dans ce rapport, nous nous focaliserons sur les conditions de développement embryonnaire et nous considérerons que la fécondation a eu lieu dans des conditions favorables. C'est-à-dire que les gamètes ont fécondé et ont donné un zygote avec deux noyaux plurinucléés et deux groupements polaires.

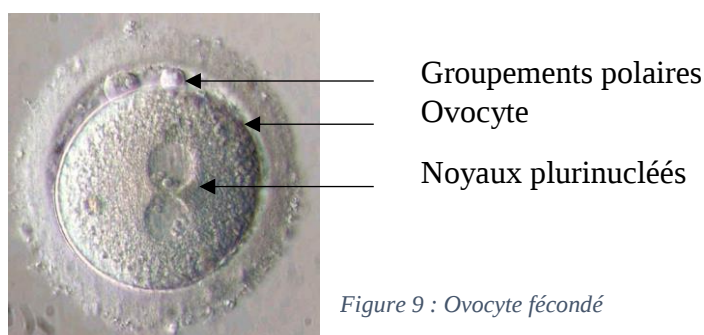


Figure 9 : Ovocyte fécondé

Les besoins embryonnaires

Dans un premier temps, l'embryon est très difficile en termes de pH-métrie. En effet, il ne tolère que de très faibles variations de pH. Le milieu de culture doit avoir un pH situé entre 7,2 et 7,4. Ce pH va être défini d'une part par le milieu de culture mais aussi par l'incubateur qui va libérer des gaz (O_2 à 5%, Azote) et notamment une forte concentration de CO_2 (5%) qui agit directement sur le pH via la réaction : $CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO^3 \rightarrow HCO^{3-} + H^+$.

Les incubateurs ont aussi un autre rôle : ils maintiennent les conditions d'humidité et la température.

Les incubateurs ont un rôle essentiel, ils assurent la stabilité de différents paramètres :

➤ **La qualité de l'air**

C'est un facteur très important pour la survie et le développement. L'incubateur possède des filtres afin d'éliminer les particules solides, les microorganismes et les composés organiques volatiles dont certains ont des actions très délétères sur la fécondation in vitro.

➤ **L'homéostasie**

L'homéostasie est définie par la constance de l'état d'équilibre idéal pour la culture cellulaire.

➤ **La température**

Elle doit être maintenue à 37°C pour le maintien en vie des embryons.

➤ **Le pH**

Le pH doit être maintenu entre 7,25 et 7,35. La stabilité s'obtient grâce à l'utilisation de mélange-tampons. Un mélange tampon est un milieu permettant l'absorption de substances pouvant changer la valeur du pH. Le plus utilisé est le bicarbonate/AC carbonique. Il impose une étuve parfaitement réglée en mélange gazeux (de 5% à 6% de CO_2 selon le milieu utilisé)

➤ **L'osmolarité**

Ce facteur correspond au nombre de particules osmotiquement actives par litre de solution. Elle doit se situer entre 275 et 285 mOsm/kg. La culture sous huile consiste à recouvrir la culture embryonnaire d'huile minérale inerte (type paraffine), cela permet de ne pas altérer l'osmolarité de la culture pendant les manipulations en dehors des incubateurs.

Pour obtenir la constance de l'ensemble de ces paramètres au sein des incubateurs, il est primordial de les ouvrir le moins souvent possible et donc de disposer de plusieurs incubateurs attribués à des tâches homogènes.

Les incubateurs participent activement à la diminution du stress oxydatif. Ce stress est le phénomène d'oxydation cellulaire qui altère l'ADN et est très péjoratif pour l'embryon. Les incubateurs classiques sont des incubateurs à injection de CO_2 dans l'air. L'injection de diazote (N) dans l'incubateur permet de réduire au maximum la proportion de dioxygène et ainsi de réduire le stress oxydatif. L'utilisation d'incubateurs trigaz (CO_2 , O_2 et N) a contribué à une augmentation des taux de grossesses des centres de PMA. En effet, ces incubateurs injectent du diazote en plus du CO_2 dans leur enceinte.

Les milieux de culture ont pour but de mimer l'environnement biochimique rencontré par l'embryon à chaque moment de sa vie à l'état libre, c'est-à-dire avant son implantation. Ces milieux présentent une composition biochimique analogue à celle du fluide tubaire puis à celle du fluide utérin.

Ils ont comme mission d'alimenter l'embryon en **nutriments** mais aussi de le maintenir dans un environnement stable. C'est donc la source nutritive et ils lui apportent les vitamines, le glucose et les ressources nécessaires à son développement à tous les stades.

Dans un laboratoire, la quantité de ce réactif utilisée est énorme et le challenge principal est de combiner l'aspect biologique (efficacité, qualité du milieu) et l'aspect économique (coût raisonnable).

Matériels et méthodes

Etude 1 : Les milieux de culture

Le tableau suivant (*tableau 1*) présente les deux milieux de culture étudiés : le Global (milieu 1) et le Gain (milieu 2).

	Global	Gain
Composition en protéines	Doit être supplémenté avec 10% de protéines (albumine) pour éviter la formation de radicaux libres et l'oxydation 1 volume de HSA pour 9 volumes de Global	3,5 g/L d'albumine Pas besoin d'être supplémenté
pH optimal	7,27 – 7,33	7,28 – 7,31
Température optimale	37°C	37°C
Durée de vie après ouverture	7 jours	7 jours
Conservation	2 à 8°C	2 à 8°C
Tarif flacon 50ml	115,50\$ soit 98,53€	119,68\$ soit 102,12€
HSA (12 x 5ml)	259,35\$ soit 221,13€	Pas nécessaire
Photographies		

Tableau 1 : les deux milieux de culture étudiés

En réalité, le Global et le Gain sont deux milieux semblables en termes d'utilisation et de propriétés. La différence majeure est que le Global doit être supplémenté tandis que le Gain est prêt à l'emploi. Il y a donc une réelle différence de coût pour le laboratoire si la dépense pour le HSA peut être éliminée. C'est pour cela qu'il est intéressant de tester l'efficacité du Gain afin de savoir s'il peut remplacer le Global.

La première étude concerne 91 patientes de moins de 38 ans en situation de FIV ou d'ICSI. Tous les embryons ont été cultivés en atmosphère trigaz en incubateur classique (5% d'O₂ et 5% de CO₂), sous huile et dans des gouttes de 25 microlitres. Les cohortes ovocytaires puis embryonnaires ont été divisés en deux dans la même boîte de culture (*figure 1*) de façon à travailler dans les mêmes conditions physico-chimiques.

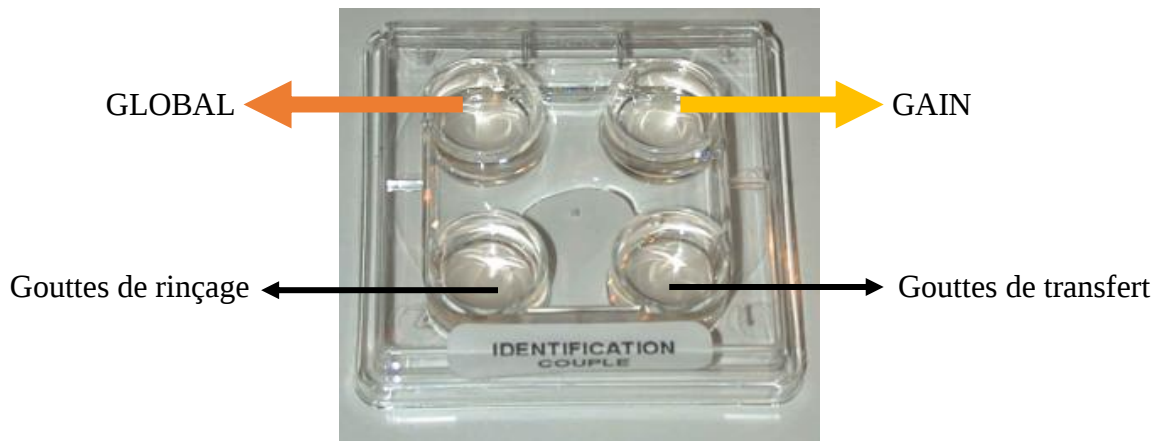


Figure 10: Illustration de la disposition d'une boîte de culture utilisée pour l'étude

Les données ont été récoltées durant les 8 semaines de stage avec un suivi précis de l'évolution de l'embryon suivant le milieu de culture où il est déposé. Ce suivi a été réalisé sous contrôle du biologiste chaque jour à l'heure idéale de lecture. Les renseignements ont été saisis sur une feuille dédiée puis répertoriés sous format numérique grâce au logiciel Excel.

On a finalement, 31 tentatives de FIV et 60 tentatives d'ICSI, avec au total 613 ovocytes.

- 297 embryons ont été cultivés dans le milieu 1 : Global supplémenté avec 10% de protéines.
- 316 embryons ont été cultivés dans le milieu 2 : Gain (pas nécessaire de le supplémenter).

Les cultures dans ces milieux ont débuté à J2 jusqu'à J3 ou J5 suivant les cas.

On considère donc la qualité embryonnaire comme paramètre pour définir un milieu de culture « favorable » ou « défavorable ». Il existe plusieurs codifications pour classer la qualité embryonnaire : Grade allant de 1 à 4 (ou de A à C) qui permettent de qualifier l'embryon de "top quality" ou de qualité intermédiaire.

La qualité embryonnaire a été évaluée à partir de la classification Blefco à J2 et J3. Cette classification évalue la qualité embryonnaire suivant des critères bien précis

- Le pourcentage de débris et de fragmentation
- L'axe de symétrie et la régularité de la taille des cellules : embryon typique ou atypique
- La vitesse de division cellulaire traduite par le nombre de cellules

La classification à 3 chiffres (BLEFCO France) est celle qui est proposée ci-dessous :

- ✓ 1^{er} chiffre : Nombre de blastomères, généralement de 4 à J2 et 8 à J3
- ✓ 2^{ème} chiffre : Forme des blastomères : 1 → typique (normale) 2 → atypique
- ✓ 3^{ème} chiffre : Taux de fragmentation : de 1 → inférieur à 10% à 3 → supérieur à 50%

Cette classification ne tient pas compte de la multi-nucléation des blastomères



Figure 11 : Embryon de haute qualité à J2

On voit bien sur cette capture d'image un embryon à quatre cellules homogènes, circulaires, avec un axe de symétrie respecté, pas de fragmentation. Cet embryon pourrait être transféré



Figure 12 : Embryon de haute qualité à J3

Sur cette figure, au stade J3 on a bien un embryon de très bonne qualité avec huit cellules homogènes, circulaires, un axe de symétrie très correct et une très légère fragmentation. C'est un embryon transférable à J3.

Les embryons présentant une fragmentation inférieure à 20% et avec 4 ou 5 blastomères à J2 et 8 à 10 blastomères à J3 ont été qualifiés de haute qualité.

L'évaluation de la qualité embryonnaire se fait lors des lectures quotidiennes grâce à un microscope inversé.

Le nombre d'embryons maintenus jusqu'à J5 n'a pas été suffisant pour tirer des conclusions intéressantes.



Figure 13 : Microscope inversé

Etude 2 : Les incubateurs

Le tableau suivant (tableau 2) présente les deux incubateurs comparés suivant différentes caractéristiques.

	Incubateur 1 : Astec IVF Cube	Incubateur 2 : Panasonic
Configuration	4 petits tiroirs individuels	1 seul tiroir avec 1 ouverture
Paramètres	Trigaz : CO ₂ , O ₂ , N ₂ Humidité	Trigaz : CO ₂ , O ₂ , N ₂ Humidité
Chauffage	Plaque chauffante	Air chauffé
Alarmes	Alarme à la hausse pour la température	Alarme à la hausse et à la baisse pour la température
Temps de récupération pour une ouverture de 15 – 20 secondes	Maximum 1 minute	Maximum 2 minutes
Photographies		

Tableau 2 : Comparaison des deux types d'incubateurs étudiés

La principale différence à noter pour notre étude et qu'il ne faut pas négliger est le temps de récupération. L'incubateur 1 récupère les conditions définies par la biologiste et donc les conditions idéales de développement embryonnaire deux fois plus vite que l'incubateur 2.

Les données sont récoltées depuis le 12 décembre 2017 jusqu'au 12 avril 2018. La première date correspond à la mise en service de l'incubateur au sein du laboratoire de La Rochelle. La seconde date correspond à la dernière date où les résultats de grossesses des tentatives de FIV pourraient être connus afin qu'ils soient présentés dans ce rapport. Les données correspondent à 175 couples et donc à 175 tentatives. Les patientes sont âgées de 26 à 38 ans. La totalité de la cohorte a été cultivée de la même façon et suivant les mêmes paramètres seul l'étuve varie.

Cette seconde étude consiste à étudier les taux de grossesses cliniques et de grossesses vivantes suivant l'incubateur où l'embryon a été incubé durant son développement post-implantatoire.

L'hormone chorionique gonadotrope (ou bêta HCG) est synthétisée en début de grossesse lorsque l'œuf entame sa nidation dans la muqueuse utérine. Le taux de beta HCG évolue de façon croissante au début de la grossesse en doublant toutes les 48 heures et décroît ensuite à l'approche du terme. Pour définir une grossesse clinique, alors la patiente va effectuer 15 jours après le transfert de l'embryon une prise de sang qui donnera son taux de HCG, si celui-ci est supérieur à 100 alors on considère qu'il y a grossesse clinique.

Puis un mois après, des seconds tests seront effectués afin de savoir s'il y a une grossesse vivante ou non, c'est-à-dire s'il y a présence d'une activité cardiaque intra-utérine ou pas.

C'est donc sur ces deux paramètres que nous allons évaluer s'il y a une différence d'efficacité entre les deux types d'incubateurs.

Pour améliorer les résultats de l'étude 2 sur les incubateurs, un suivi pH métrique a été réalisé sur huit semaines afin de déterminer quel incubateur semble être le plus stable avec le moins de variations de pH possibles. Pour cela, les mesures sont relevées tous les Lundi à 13h grâce à une sonde calibrée. Ce créneau horaire correspond au moment où l'incubateur reste le plus longtemps fermé au préalable afin de ne pas fausser les résultats. Le milieu témoin est un milieu de culture basique conservé au moins 48h avant à l'étuve dans les mêmes conditions physico-chimiques que les embryons en culture.

Méthodes statistiques utilisées

Nous calculerons différents pourcentages :

- **Dans le cas des milieux**, nous comptabiliserons le nombre d'embryons de haute qualité à J2 et à J3 pour chaque milieu de culture.
- **Dans le cas des incubateurs**, nous étudierons les taux de grossesses cliniques et de grossesses menant à une naissance vivante pour chaque type d'incubateur.

Dans un second temps, nous évaluerons la significativité de nos résultats grâce aux tests statistiques et à la p-value.

Les résultats seront traités et analysés avec un test Z à l'aide du logiciel XLstat 2010.



Le test Z est un test paramétrique permettant de comparer les moyennes de deux échantillons. La méthode de calcul est différente en fonction de la nature des échantillons. Dans notre cas il s'agit d'échantillons indépendants. Nous calculerons la p-valeur afin de déterminer si nos résultats sont significatifs ou non en fonction du seuil de significativité.

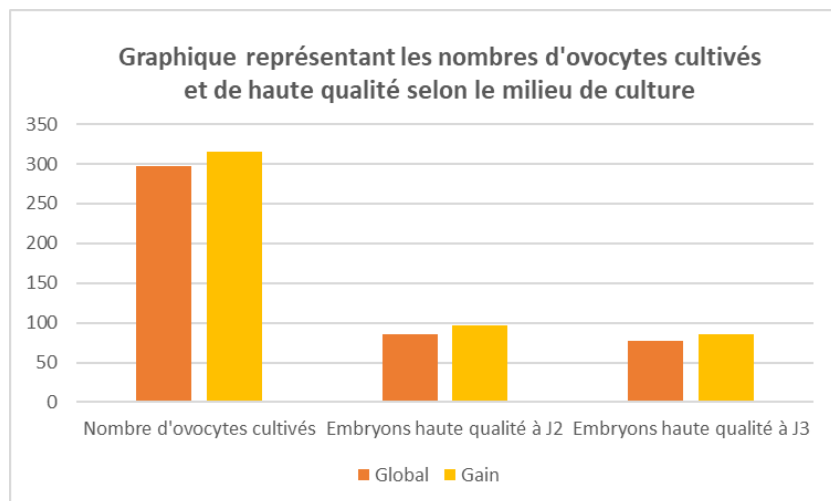
Résultats

Etude 1 : Les milieux de culture

	Global	Gain
Nombre d'ovocytes cultivés	297	316
Embryons de haute qualité à J2	86 → 29%	97 → 31%
Embryons de haute qualité à J3	77 → 26%	85 → 27%

Ce tableau récapitule les résultats obtenus à la fin de la récolte de données. On y trouve les nombres bruts mais aussi les taux en pourcentage calculés à partir de ces données.

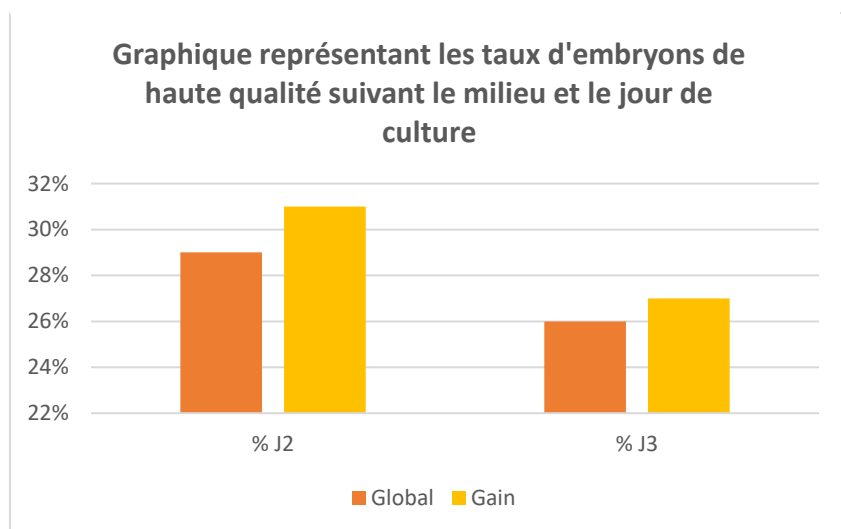
Tableau 3 : Résultats de l'étude 1



Ce graphique représente les données chiffrées obtenues suivant le milieu de culture utilisé.

On observe que les résultats sont assez proches entre le Gain et le Global.

Figure 14 : Histogramme représentant les résultats en chiffres de l'étude 1



Ce graphe nous présente les pourcentages d'embryons de haute qualité en Jour 2 et à Jour 3 suivant le milieu de culture utilisé.

Figure 15 : Histogramme représentant les taux de qualité embryonnaire de l'étude 1

Résultats statistiques :

A l'aide du logiciel XLstat 2010, on obtient :

- Pour J2 : 29% pour le Global contre 31% pour le Gain avec une p-valeur $p = 0,71$
- Pour J3 : 26% pour le Global contre 27% pour le Gain avec une p-valeur de $p = 0,89$

Etude 2 : les incubateurs

Ici, on note Grossesse C pour grossesse clinique, et Grossesse V pour grossesse vivante. Le pourcentage de grossesses vivantes est lié au nombre initial de grossesses cliniques obtenues. La mention « Echec » traduit que la tentative de PMA n'a pas abouti à une grossesse.

	INC 1	INC 2	Total
Tentatives	108	67	175
Grossesse C	39	21	60
Grossesse V	34	18	52
Echec	69	46	115

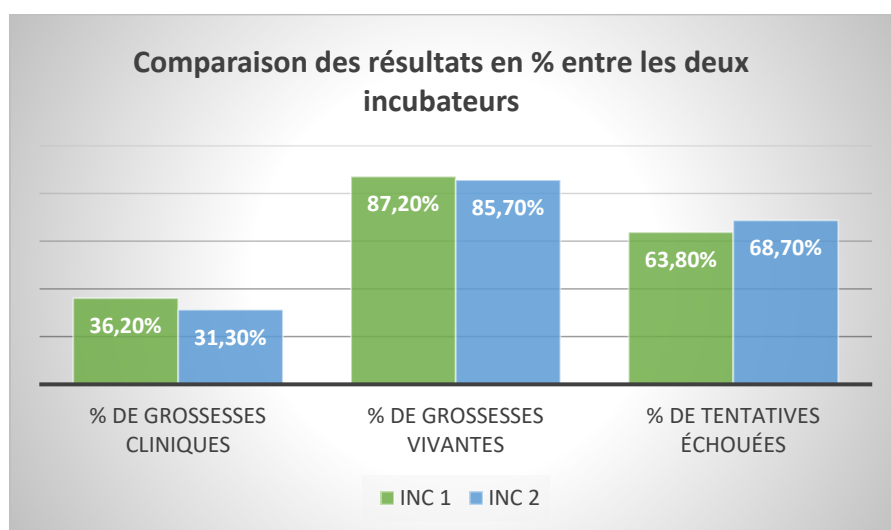
Tableau 4 : Résultats de l'étude 2

Dans ce tableau, sont synthétisés les nombres de grossesses obtenues ainsi que les échecs comptabilisés.

	INC 1	INC 2	Total
Tentatives	108	67	175
Grossesse C	36,20%	31,30%	35,40%
Grossesse V	87,20%	85,70%	85,50%
Echec	63,80%	68,70%	64,60%

Tableau 5 Taux obtenus avec l'étude 2

Ici, les taux de grossesses cliniques sont présentés ainsi que les taux de grossesses vivantes qui en résultent.



Cette histogramme permet de visualiser les différences de pourcentages entre les deux incubateurs. On remarque peu de différence, les valeurs sont très proches.

Figure 16 : Comparaison des taux obtenus de l'étude 2

Pour affiner nos résultats et comprendre pourquoi l'incubateur 1 semble être plus efficace, un suivi pH métrique a été réalisé pendant les 8 semaines de stage. De façon hebdomadaire, le pH dans un milieu de culture dit « témoin » a été relevé. On sait que les embryons sont très sensibles aux variations de pH et ce suivi nous permet alors d'évaluer quel incubateur semble avoir le pH le plus stable au cours du temps.

	pH INC 1	pH INC 2
Semaine 1	7,31	7,37
Semaine 2	7,29	7,35
Semaine 3	7,3	7,38
Semaine 4	7,29	7,32
Semaine 5	7,29	7,3
Semaine 6	7,3	7,35
Semaine 7	7,31	7,36
Semaine 8	7,3	7,34

Tableau 6 : Suivi pH métrique sur 8 semaines

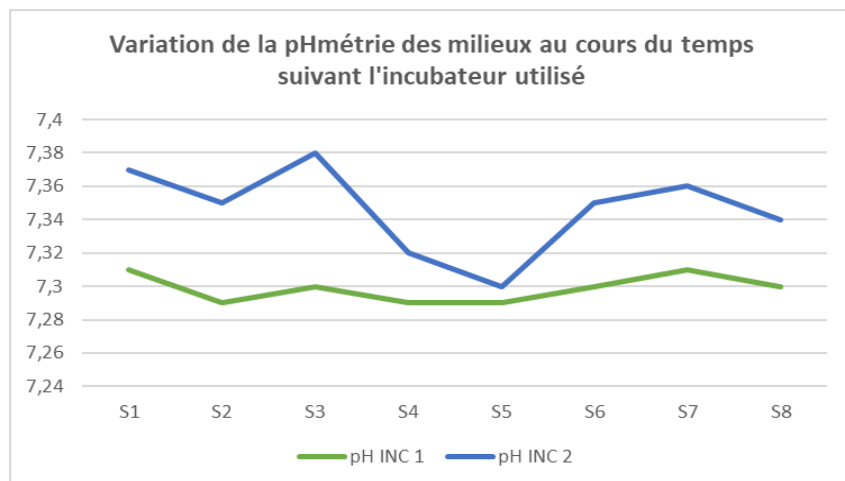


Figure 17 : Courbe des variations de pH suivant l'incubateur utilisé sur 8 semaines

Le tableau 6 représente les valeurs relevées chaque semaine au même moment. Elles représentent le pH dans le milieu témoin (pH optimal : 7,2 – 7,4). La courbe de la figure 15 résulte de ces données, plus elle est linéaire moins il y a d'écarts de pH et moins il y a de variations.

Ces résultats semblent confirmer la tendance précédente. L'incubateur 1 connaît de plus légères variations de pH et donc cela pourrait expliquer pourquoi il semble être plus performant.

Discussion

Etude 1 : Les milieux de culture

Les résultats obtenus lors de la première étude semblent porter un léger avantage au milieu 2 c'est-à-dire le Gain. Cette étude portée sur 91 patientes a eu lieu pendant huit semaines. On remarque un manque de significativité exprimé via la valeur de p. Il paraît donc compliqué de tirer des conclusions pertinentes concernant l'efficacité de ce milieu comparé au Global. Pour améliorer l'étude, il serait intéressant de la prolonger afin d'obtenir un échantillon plus grand avec plus de données sur du plus long terme. D'ailleurs, poursuivre l'étude sur un pas de temps plus étendu permettrait aussi de la compléter avec un suivi des taux de grossesses cliniques afin de voir une corrélation entre qualité embryonnaire et grossesses cliniques.

On peut imaginer que si cette tendance se poursuit, alors l'utilisation totale du Gain pourrait être un réel avantage pour l'entreprise. En effet, le coût du flacon de Gain est légèrement supérieur à celui de Global mais il faut prendre en compte que le Global doit être supplémenté en protéine. Le réactif alors utilisé : le HSA coûte extrêmement cher et représente un budget conséquent pour le laboratoire. Le Gain ne nécessite pas cette supplémentation et se suffit à lui-même. D'un aspect économique, il est donc intéressant d'opter pour un passage au Gain.

D'un point de vue biologique, ce milieu semble fournir au moins les mêmes résultats en qualité embryonnaire, il est donc tout à fait possible de l'utiliser.

Etude 2 : Les incubateurs

On observe que les résultats du suivi des taux de grossesses cliniques et vivantes suivant l'incubateur laissent penser qu'il y aurait un léger avantage à l'incubateur Astec IVF Cube. Cette étude a été réalisée jusqu'au 12 avril 2017, effectivement, il a fallu considérer un délai minimum d'un mois afin de connaître les issus des grossesses cliniques (vivantes ou non). Pour perfectionner la significativité, il faudrait prolonger la récolte de résultats. En parallèle, deux paramètres pourraient expliquer le meilleur taux de grossesses cliniques et vivantes pour des embryons incubés dans l'incubateur Astec IVF Cube.

D'une part, le temps de récupération est un élément majeur qui traduit un bon incubateur. Cela signifie qu'il est capable de récupérer les paramètres initiaux plus ou moins rapidement après ouverture de l'emplacement. L'incubateur 1 met deux fois moins de temps à récupérer que l'incubateur 2. Cela peut s'expliquer par l'agencement des compartiments. On voit bien que dans l'incubateur Astec, il s'agit de quatre petits tiroirs individuels, c'est donc plus rapide à regazer lorsque le tiroir est ouvert. Tandis que pour l'incubateur Panasonic, le volume à récupérer est beaucoup important.

Ce facteur a une influence directe sur la pH métrie, en effet on constate que l'incubateur 1 connaît moins de variations de pH que l'incubateur 2. Or ce type de modifications influe directement sur l'embryon et provoque un stress oxydatif non négligeable.

Corrélation et analyse des études menées

Finalement, on peut conclure qu'il faudrait poursuivre ces études sur une cohorte plus importante pour objectiver ou non l'écart numérique. Les performances sont plus ou moins identiques pour les populations étudiées et un projet est en cours d'un commun accord entre le biologiste et moi-même afin de prolonger la récolte de données avec finalement la publication d'un poster scientifique pour le congrès national de la reproduction (FFER) en Août 2018.

Malgré tout, on semble voir une tendance favorable au moins pour le GAIN (+ 2 %) et l'arrivée du nouvel incubateur paraît être une réussite. Mais nos résultats obtenus sont tout de même difficilement exploitables en l'état actuel du schéma expérimental.

Le contexte actuel du laboratoire d'une diminution des taux de réussite (caractérisé à la fois par la qualité embryonnaire et les taux de grossesses) peut être expliqué par une multiplicité de raisons. Les études menées confirment tout de même que cette régression n'est pas causée par ces deux paramètres biologiques. Le biologiste en PMA a la responsabilité de décider de chaque outil utilisé au sein de son laboratoire, il n'existe pas de protocole prédéfini : tous les choix stratégiques lui appartiennent afin d'assurer la réussite d'un maximum de tentatives. Il est donc très important de pouvoir déterminer les raisons d'une baisse d'activité afin de pouvoir rebondir et inverser cette tendance négative.

Les milieux de culture et les incubateurs ne sont pas les responsables. Pour comprendre, d'autres pistes restent à explorer. La difficulté de ce domaine scientifique est qu'il cumule énormément de paramètres et d'acteurs. D'une part les cliniciens gynécologues régulent le nombre de rendez-vous et de prises en charge, si ces derniers ne prennent pas beaucoup de nouveaux patients alors forcément les résultats du laboratoire baisseront. De plus, un des acteurs principal est le couple. Les taux de réussites sont conditionnés par de nombreux facteurs externes : l'hygiène de vie, le tabagisme, l'alcoolisme, le stress, le poids, la psychologie de la patiente et bien sur l'aspect médical avec la cause plus ou moins grave de l'infertilité.

C'est donc très compliqué de déterminer précisément la raison d'une baisse du nombre de grossesse. Souvent, cela résulte d'un ensemble de causes accumulées provoquant le même effet : des échecs de tentatives.

A cela doit s'ajouter le contexte économique : les matériaux de plus en plus chers, avec beaucoup de concurrence et nouveaux produits sur le marché. Parfois il faut prendre le risque de tester de nouveaux produits afin de trouver des issues et des solutions.

L'importance des incubateurs et des milieux de culture a été démontrée au travers de ce rapport scientifique. Ils permettent une culture embryonnaire réussie ou non. L'objectif final étant de transférer un embryon de bonne qualité à J2, J3 ou bien J5 (cas rares, seulement 15% des tentatives vont jusqu'au stade de blastocyste) afin de maximiser les chances qu'il s'implante et donc qu'il parvienne jusqu'à la formation d'un fœtus.

Conclusion

Pour conclure, ce rapport a permis d'étudier deux paramètres biotechnologiques nécessaires au bon déroulement d'une fécondation in vitro classique ou par micro-injection. De façon plus générale, des tests statistiques plus poussés ont démontré que ces outils entraînent des hausses mathématiquement significatives des taux de réussite.

Les données des résultats de la FIV en France sont publiées sur le site internet de l'Agence de Biomédecine. En 10 ans le taux de succès global en FIV en France est passé de 20% environ à 35% environ. On sait que la population infertile est toujours du même type c'est-à-dire avec la même répartition des types d'infertilité (*figure 3*).

On peut penser que c'est l'ensemble de ces avancées technologiques qui ont chacune été testées et qui ont chacune fait la preuve de leur efficacité, qui a entraîné la hausse générale des taux de grossesse en FIV.

La maîtrise de tous les paramètres environnementaux, l'extrême précision des techniques de manipulation et d'observation profiteront aussi à d'autres domaines de la biologie cellulaire.

Mais surtout un travail de recherche encore plus poussé sur le plan fondamental pourra aider à développer à l'avenir d'autres méthodes plus performantes encore et faire toujours progresser les résultats.

Les taux de succès encore inférieurs à 50% par tentatives dépasseront peut-être un jour ce seuil par l'utilisation de diagnostics génétiques sur biopsie embryonnaire faisant appel aux puces à ADN. Se posera alors à ce moment, la question des limites de la science et de l'eugénisme....



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Docteur Pierre Boyer, 2012. *AMP, une banque d'image au service d'une démarche d'assurance qualité*, Laboratoire Genevier, Editions Rand

Le Moigne Albert, 2009. *Biologie du développement*, Editions Dunod

Franquinet Raphaël, 2013. *Atlas d'embryologie descriptive*, 3^{ème} édition, Dunod

M. Saint-Dizier, S. Chastant-Mallard, 2014. *La reproduction animale et humaine*, Editions Quae

P. Peycru, D. Grandperrin, C. Perrier, 2013. *Biologie tout-en-un*, Editions Dunod

C. Zacharie, 2018. *PMA, GPA : l'essor des bébés-éprouvette*. Sud-Ouest, sources : agence de la biomédecine, ILGA Europe, European society of human reproduction and embryology

Livret d'accueil (*avant-propos*), Bio 17 – source interne

Documents internes : Fiche scan X, stratégie décisionnelle

<http://fertilite-larochelle.com/>

http://www.fivfrance.com/page_embryonqualite.html

<https://www.agence-biomedecine.fr/AMP>

A.O. Trounson, Linda R. Mohr, C. Wood and J.F. Leeton, 1982. *Effect of delayed insemination on in-vitro fertilization, culture and transfer of human embryos*

V. Aoki, A. Wilcox, C. Peterson, M. Gibson, D. Carrel, K. Jones, 2005. *Comparison of four media types during 3-day human IVF*

Photographies personnelles

Mode d'emploi : *Life Global Group*

A. Bobe, N. Clanche, Y. Naamane, P.E. Moreau, 2016. *Les avancées technologiques dans la Fécondation in vitro*, Diaporama

Annexes

Annexe 1 : Tableau des tâches

Intervenant	Idée originale	Bibliographie	Mise en place protocole	Collecte de données	Rédaction
Principal	OM	CD	OM	CD	CD
Secondaire	CD	OM	CD	T	

CD : Caroline Dousset, stagiaire

OM : Olivier Moreau, maître de stage

T : Techniciennes de laboratoire

Annexe 2 : Calendrier de stage

	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4	Semaine 5	Semaine 6	Semaine 7	Semaine 8	Après stage
Bibliographie									
Expérimentation									
Statistiques									
Rédaction									
Poster scientifique									

20