

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

---

Année 2016

N° 049

**MEMOIRE  
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional  
Le 19 Avril 2016

Par Mr Arnaud REIGNIER  
Né le 04/06/1987

Conformément aux dispositions du décret  
Du 23 janvier 2003 tient lieu de :

**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

---

EVALUATION NON INVASIVE DE LA QUALITE EMBRYONNAIRE

---

**Président :** Monsieur le Professeur Paul Barrière

**Membres du jury :** Monsieur le Docteur Thomas Fréour  
Monsieur le Professeur Damien Masson  
Madame le Professeur Berthe-Marie Imbert  
Monsieur le Docteur Laurent David

## REMERCIEMENTS

---

*Je tiens à remercier chaleureusement*

### **Monsieur le Professeur Paul BARRIERE**

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de notre jury. Vos conseils et votre bienveillance m'ont été précieux depuis mon arrivée dans le laboratoire de Biologie de la Reproduction, soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

### **Monsieur le Docteur Thomas FREOUR**

Tu m'as fait découvrir la Biologie de la Reproduction. Ton dynamisme, ton sens de la pédagogie et ta sympathie ont été un des moteurs de mon orientation. Trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

### **Monsieur le Docteur Laurent DAVID**

Tu m'as accueilli dans ton équipe de recherche. Ta réflexion et ton sens critique m'ont été très précieux et je t'en suis très reconnaissant.

### **Monsieur le Professeur Damien MASSON**

Pour ton soutien, ton aide et ta sympathie dans ce projet et depuis le début de mon internat.

### **Madame le Professeur Berthe-Marie IMBERT**

Pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail.

Carole Spingart et Sophie Mirallié pour m'avoir transmis votre passion pour la Biologie de la Reproduction. Votre enseignement quotidien et votre bonne humeur ont été un vrai bonheur ces dernières années.

Jenna, travailler quotidiennement avec toi est aussi agréable que ton amitié. En espérant que les deux durent longtemps.

L'ensemble du Laboratoire de Biologie de la Reproduction pour leur patience et leur encadrement. Merci à Delphine pour ta sympathie, tes bons gâteaux et nos échanges de plantes. Merci à Sandrine pour ta bonne humeur, ton franc-parler et ton sérieux.

Stephanie Killens et Diego Moreno pour m'avoir fait partager leur goût pour la recherche. Anne et Caroline pour leur patience et leurs rires.

Mes amis biologistes qui m'ont soutenu tout le long de cet internat, ont bu des binches avec moi et surtout Fantou pour sa shrana, AG et son KC, So, Justin et Mat Greg.

Mes parents pour m'avoir toujours aimé et encouragé.

Alexis et Thomas pour tout ce que l'on partage.

Moumoune et Caro pour être aussi drôles et aimantes.

Fanny, les Guivarch, Jeremy, Fabien pour être de si bons amis.

Raphael pour tout ce qui nous attend.

" Si vous saviez, lorsque vous commencez à écrire un livre, ce que vous allez dire à la fin, croyez-vous que vous auriez le courage de l'écrire ? "

Michel Foucault [octobre 1982]

## TABLE DES MATIERES

---

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	2
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	6
<b>TABLE DES TABLEAUX</b> .....	8
<b>GENERALITES</b> .....	9
<b>Time lapse</b> .....	12
<b>Preimplantation Genetic Screening</b> .....	16
<b>Analyse de la physiologie embryonnaire et mise-en-évidence de nouveaux marqueurs</b> 18	
Metabolomique .....	18
Rappels sur le métabolisme embryonnaire pré-implantatoire.....	19
Métabolisme du glucose .....	20
Acides Aminés .....	21
Protéomique.....	21
Acides nucléiques circulants .....	23
Combinaison / association de marqueurs .....	24
<b>OBJECTIFS</b> .....	26
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	27
<b>Etudes rétrospective de la base de données de l'Embryoscope</b> .....	28
<b>Identification de biomarqueurs dans le milieu de culture embryonnaire</b> .....	28
Création d'une bio-collection de milieux de culture embryonnaires.....	28
Etude du métabolisme embryonnaire à la recherche d'un biomarqueur dans le milieu de culture embryonnaire .....	29
Recherche de micro-ARN dans le milieu de culture embryonnaire.....	29
Recherche de marqueur protéique par immunodosage.....	31
<b>Méthodologie statistique</b> .....	32
<b>RESULTATS</b> .....	33
<b>Analyse de la base de données de l'Embryoscope</b> .....	34
<b>Identification de biomarqueurs dans le milieu de culture embryonnaire</b> .....	36
Dosage du glucose et lactate .....	36
Recherche de micro-ARNS dans le milieu de culture embryonnaire .....	37
Recherche de marqueurs protéiques dans le milieu de culture.....	38
<b>DISCUSSION</b> .....	41
<b>Analyse rétrospective de la base de données de l'Embryoscope</b> .....	42
<b>Identification de biomarqueurs dans le milieu de culture embryonnaire</b> .....	44

Analyse du métabolisme embryonnaire par le dosage du glucose et du lactate dans les milieux de culture embryonnaire .....	44
Recherche d'acides nucléiques dans le milieu de culture embryonnaire .....	46
Recherche de marqueurs protéiques dans le milieu de culture .....	49
<b>CONCLUSION</b> .....	52
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	54

## TABLE DES FIGURES

---

**Figure 1** : Taux de naissance en fonction d'un score embryonnaire morphologique et selon l'âge maternel.

**Figure 2** : Arbre décisionnel de sélection embryonnaire en fonction des paramètres morphocinétiques embryonnaires et présentation des taux d'implantation embryonnaires en fonction

**Figure 3** : Schéma récapitulatif des modifications métaboliques au cours du développement embryonnaire précoce in vitro.

**Figure 4** : Arbre décisionnel basé sur les paramètres morphocinétiques embryonnaires et la présence d'IL-6 dans le milieu de culture embryonnaire.

**Figure 5** : Principe de la recherche de micro-ARNs par RT-qPCR avec le kit miScript Primers Assay (QIAGEN)

**Figure 6** : Principe de la technologie Luminex

**Figure 7** : Dosage du glucose et lactate dans les milieux de culture embryonnaire G1 et G2 (Vitrolife) d'embryons transférés à l'aide de bandelettes et lecteurs de dosage rapide (StatStrip) en fonction de l'implantation embryonnaire.

**Figure 8** : Présentation des courbes de fusion et de la migration par électrophorèse capillaire (Caliper) d'un contrôle négatif (à gauche) et d'un échantillon (à droite) après RT-qPCR avec le kit miScript Primers Assay (QIAGEN) pour mir-191 dans un milieu de culture embryonnaire G2-Plus (Vitrolife) ayant servi à la culture d'un blastocyste humain transféré.

**Figure 9** : Gamme de standards pour BMP-2, BMP-4, IL6, SCF, Cripto-1 et GDF-15 sur automate Luminex®. Chacun des points de gamme a été réalisé en duplicate.

**Figure 10** : Graphique représentant les résultats obtenus pour dix standards avec les techniques enzymatiques en microgoutte et en système microfluidique.

**Figure 11** : présentation des valeurs de Delta-Ct pour miR-20a et miR-30c dans des milieux de culture embryonnaire en fonction de l'implantation embryonnaire.

**Figure 12** : Distribution de la présence ou absence d'IL-6, SCF ou INF $\alpha$  dans des milieux de culture embryonnaire en fonction de l'implantation embryonnaire.

## TABLE DES TABLEAUX

---

**Tableau 1** : Résultats de l'analyse rétrospective de la base de données de l'Embryoscope® du CHU de Nantes.

**Tableau 2** : Moyenne des rapports du signal de fluorescence des 40 milieux de culture par rapport au signal de fluorescence du blanc pour chacun des paramètres recherché

**GENERALITES**

---

Le but de l'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) est d'offrir à des couples inféconds la naissance d'un enfant en bonne santé. Depuis la naissance de Louise Brown en 1978, puis l'avènement de l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) en 1992, de nombreuses améliorations dans les techniques de Fécondation In Vitro (FIV) ont permis la naissance de millions d'enfants. En effet on considère actuellement que dans les sociétés occidentales, jusqu'à 5% des enfants naissent des techniques d'AMP chaque année (1). Cependant, malgré une prise en charge de l'infertilité des couples de plus en plus démocratisée, seuls 25% des couples ayant recours à une FIV ou ICSI deviennent parents à chaque tentative (2). On estime au niveau national qu'environ 60% des couples auront un enfant à la suite de leur prise en charge.

Ces taux de réussite limités sont la conséquence du faible niveau de fécondité de l'espèce humaine (3), de l'âge féminin au moment du désir de grossesse de plus en plus élevé (en moyenne 31 ans en 2015 en France) et du fort taux d'aneuploïdie embryonnaire (4) dans l'espèce humaine, celui-ci augmentant avec l'âge maternel.

L'obtention d'une grossesse en FIV est multifactorielle, de nombreuses variables étant impliquées dans le processus : qualité ovocytaire, qualité spermatique, état de la muqueuse utérine, environnement maternel, stimulation hormonale ovarienne.

Actuellement, la seule technique de sélection embryonnaire universellement reconnue est l'évaluation de la morphologie embryonnaire précoce. Les différents aspects de cette évaluation ont fait l'objet d'un consensus européen en 2011 (5). Ce consensus donne des recommandations sur l'heure de lecture des embryons après insémination ou injection et propose une classification de la morphologie embryonnaire du zygote au blastocyste, permettant d'uniformiser les pratiques entre les différents laboratoires. Malgré ce consensus, l'évaluation morphologique reste assez peu sensible et reproductible avec une valeur prédictive positive modeste. Ainsi, la figure 1 présente les taux de naissance en fonction du score embryonnaire et de l'âge maternel.

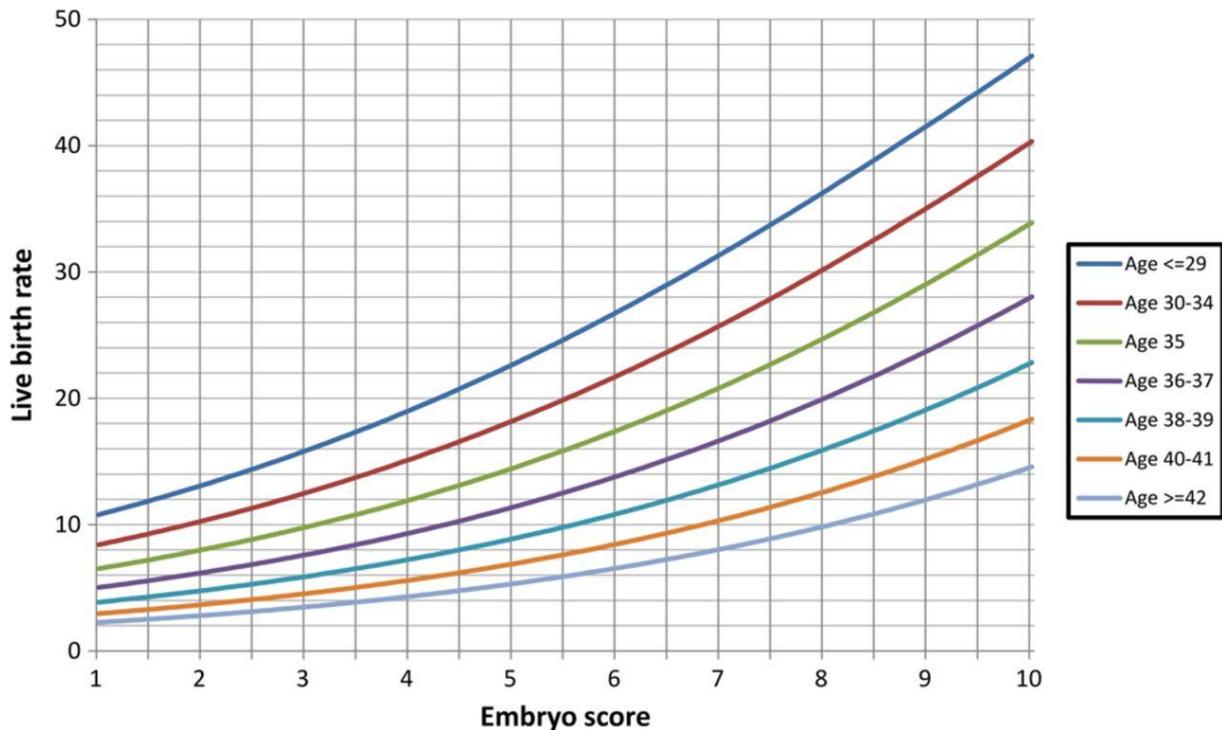


Figure 1 : Taux de naissance en fonction d'un score embryonnaire morphologique et selon l'âge maternel (Rhenman et al. Human Reproduction Update, 2014)

De plus, les résultats de l'évaluation morphologique semblent souffrir d'une grande variabilité intra- et inter-observateurs (6) (7).

Les dernières années de la discipline ont été marquées par deux événements concomitants et indissociables : l'avènement du transfert sélectif d'embryon unique (8) et le développement de la vitrification embryonnaire (9) permettant ainsi la conservation de taux cumulés de grossesse identiques tout en limitant le risque de grossesse gémellaire. En effet, la vitrification embryonnaire a permis de privilégier la cryoconservation des embryons surnuméraires plutôt que le transfert embryonnaire multiple grâce à des taux de survie et développement embryonnaires après décongélation bien supérieurs à ceux obtenus par congélation embryonnaire lente, technique utilisée auparavant. Ainsi il est aujourd'hui possible de transférer un seul embryon, habituellement celui ayant le meilleur score morphologique, et de vitrifier les embryons surnuméraires sans altérer les chances de grossesse des couples, tout en limitant les complications liées aux grossesses multiples.

Dans une optique de maîtrise des coûts de santé, de l'amélioration du vécu des patients et de développement d'une approche personnalisée, un des enjeux majeurs

de l'AMP consiste actuellement en l'amélioration des paramètres de sélection embryonnaire limitant ainsi le nombre de cycles d'AMP et de transferts embryonnaires nécessaires à l'obtention d'une naissance vivante.

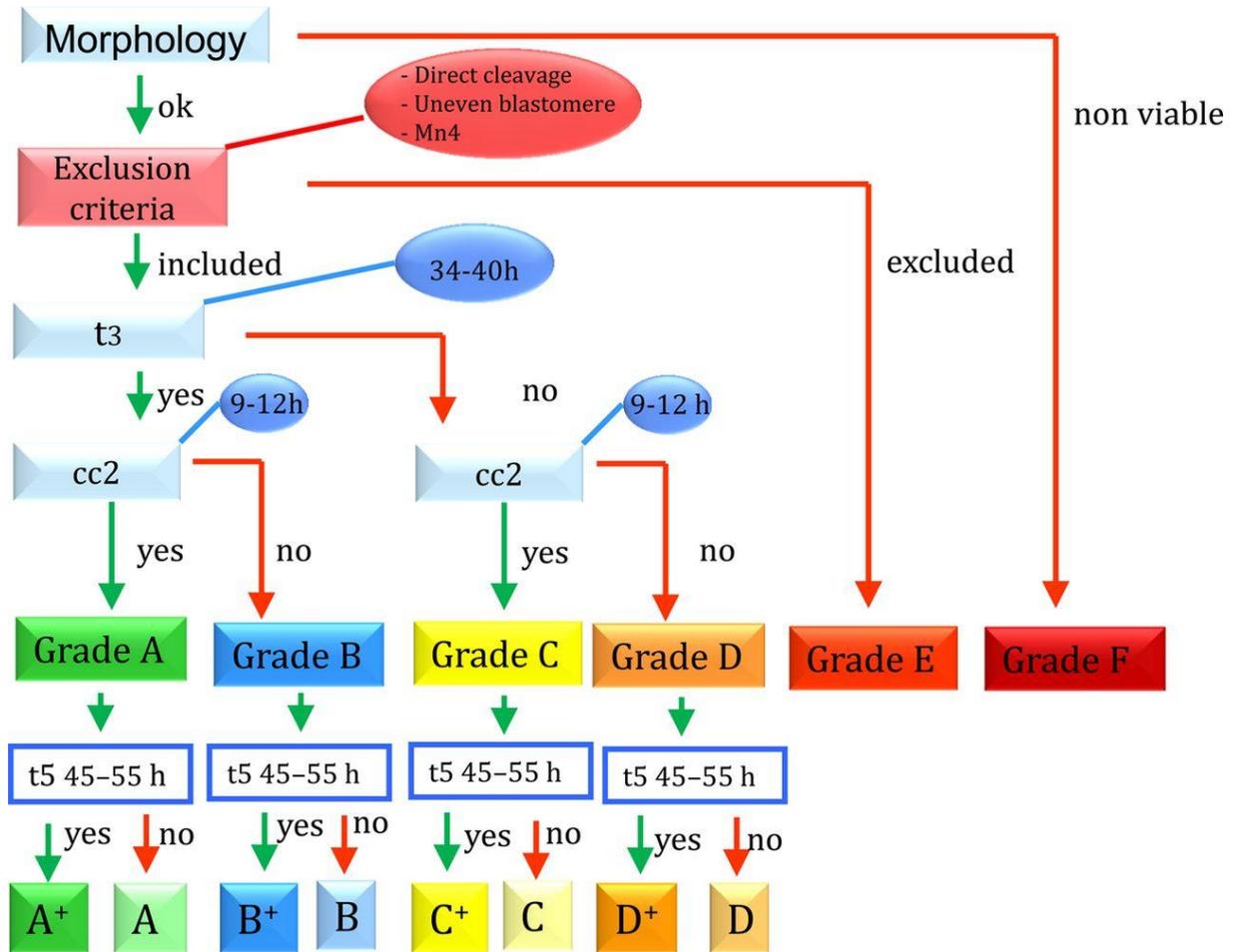
L'identification de marqueurs prédictifs de l'implantation embryonnaire a donc été un terrain de recherche important en embryologie humaine et a concerné plusieurs aspects de l'embryologie dont chacun sera développé ci-après. Ainsi trois grands domaines seront étudiés : l'étude de la morphocinétique embryonnaire à l'aide des incubateurs équipés de systèmes time-lapse, l'analyse de la ploïdie embryonnaire et la recherche de biomarqueurs moléculaires dans le milieu de culture embryonnaire. L'objectif de ce mémoire est de réaliser un état des connaissances concernant l'identification d'un marqueur non invasif d'implantation embryonnaire et la validation d'une partie d'entre eux.

## **Time lapse**

L'évaluation morphologique classique repose sur l'étude statique de la morphologie embryonnaire de façon quotidienne. La fréquence d'observation des embryons est en effet limitée par la rupture de l'homéostasie des conditions de culture embryonnaire. Cependant il a été montré que la morphologie embryonnaire et donc son évaluation pouvait varier considérablement en quelques heures (10). Ces limitations ont été outrepassées par le développement de systèmes time-lapses qui permettent non seulement l'évaluation morphologique embryonnaire mais également l'étude des processus dynamiques ayant lieu au cours du développement embryonnaire précoce. En effet ces systèmes sont composés de caméras permettant une acquisition d'image de chaque embryon dans différents plans et ce à intervalle régulier. Une interface informatique permet ainsi de visualiser l'ensemble du développement embryonnaire de chaque embryon sous forme de film et de procéder à une annotation manuelle des différents évènements cellulaires et morphologiques du développement embryonnaire précoce tout en garantissant des conditions de culture optimales stables.

Depuis la commercialisation des premiers systèmes time-lapse, de nombreuses études ont porté sur l'étude de la morphocinétique embryonnaire précoce et la mise en évidence de caractéristiques prédictives du développement embryonnaire, de blastulation ou du potentiel implantatoire de l'embryon. Ainsi Lemmen et al (2008) (11) ont décrit que les embryons à l'origine d'une grossesse évolutive présentaient un meilleur synchronisme de clivage et d'apparition des noyaux au stade 2 cellules comparés aux embryons ne s'implantant pas. Wong et al. (2010) (12) affirmaient que les embryons atteignant le stade blastocyste pouvaient être prédits par les temps du développement embryonnaire précoce : temps entre première et deuxième mitoses inférieur à 5.8h par exemple. Ainsi de nombreuses corrélations entre morphocinétique embryonnaire précoce et la capacité des embryons à atteindre le stade blastocyste ont été décrites.

Une des principales équipes travaillant sur l'analyse de la morphocinétique embryonnaire a publié en 2011 un algorithme permettant de prédire le potentiel implantatoire embryonnaire (13). Le temps jusqu'au stade 5 cellules était alors le paramètre le mieux corrélé avec les chances d'implantation. Il proposait ainsi tout d'abord d'écarter les embryons morphologiquement non viables puis d'écarter les embryons présentant au moins une des caractéristiques suivantes : (i) taille inhomogène des blastomères après la première division, (ii) passage direct du stade zygote au stade 3 cellules, (iii) multinucléation au stade 4 cellules. Après cette première évaluation, un arbre décisionnel était basé sur des valeurs de la morphocinétique embryonnaire : (i)  $t_5$ , c'est-à-dire le temps nécessaire à l'obtention du stade 5 cellules après l'insémination, (ii) CC2, la durée du second cycle de divisions cellulaires et (iii) S2, la durée correspondant au passage de 2 à 4 cellules. L'utilisation de cet algorithme a été décrite comme permettant une amélioration des taux de grossesse de 20% en comparaison de l'utilisation de l'évaluation morphologique embryonnaire classique. Ces résultats ont été ensuite confirmés par un essai clinique randomisé (14) (figure 2). Ces résultats peuvent être attribués à une meilleure sélection résultant de l'utilisation de l'algorithme mais également par la préservation de conditions de culture optimales tout au long du développement embryonnaire.



Embryo category	Sub-category	No. of embryos	Embryos implanted	Implantation rate % (95% CI)
A	+	333	106	32 (26.9-37.1)
	-	74	23	31 (20.8-42.9)
	Total	407	129	32 (27.1-36.5)
B	+	124	40	32 (23.6-40.4)
	-	61	12	20 (9.8-30.2)
	Total	185	52	28 (21.4-34.6)
C	+	70	23	33 (22-44)
	-	70	14	20 (10.5-30.5)
	Total	140	37	26 (14.8-37.2)
D	+	38	8	21 (8.1-33.9)
	-	155	30	19 (12.7-25.3)
	Total	193	38	20 (14.3-25.7)
E	Total	197	34	17 (11.7-22.3)

Figure 2 : Arbre décisionnel de sélection embryonnaire en fonction des paramètres morphocinétiques embryonnaires et présentation des taux d'implantation embryonnaires en fonction tels que décrits et validés par Rubio et al. (2014).

De nombreuses autres études rétrospectives ont identifié des paramètres morphocinétiques comme prédictifs de l'implantation embryonnaire dans la population étudiée comme décrit dans les résultats de ce travail.

L'annotation des différents phénomènes cellulaires concernant l'embryon est réalisée de façon manuelle et peut donc souffrir d'une variabilité inter et intra-opérateurs (15), même si elle reste inférieure aux variations observées dans l'évaluation morphologique embryonnaire. Afin de remédier à cette problématique, un système d'annotation automatisée jusqu'au troisième jour de développement, appelé Eeva pour « early embryo viability assesment », a été développé et est maintenant commercialisé. Il a été décrit comme permettant de prédire la capacité des embryons à se développer jusqu'au stade blastocyste à partir de deux critères principaux automatiquement détectés : P2 (temps entre le stade 2 et 3 cellules) et P3 (temps entre le stade 3 et 4 cellules). Cette analyse automatisée est facilitée par l'utilisation de lumière (foncée) pour la détection automatisée des divisions cellulaires. Les résultats préliminaires publiés à ce jour sont encourageant, avec une augmentation significative des taux d'implantation des embryons sélectionnés à partir des propositions réalisées par Eeva en comparaison d'une évaluation morphologique classique (16) (17).

Un autre challenge de l'analyse de la morphocinétique embryonnaire est de mettre en évidence l'existence de paramètres morphocinétiques reflétant le statut chromosomique embryonnaire (18). Il a alors été décrit que les embryons présentant des anomalies chromosomiques avaient un retard pour les deux premiers clivages ainsi qu'un temps entre les stades 2 et 4 cellules plus important comparé aux embryons euploïdes (19). D'autres groupes ont décrit que seuls 30% des embryons aneuploïdes présentaient des temps de divisions habituels jusqu'au stade 4 cellules (20) alors qu'il a également été décrit une absence de différence de temps de divisions aux stades précoces mais l'existence d'un retard de cavitation et d'expansion des blastocystes aneuploïdes (21). Ces résultats n'ayant pas pu être confirmés par d'autres études, il est aujourd'hui impossible de considérer le time-lapse comme pouvant remplacer l'analyse génomique embryonnaire en tant que technique de dépistage des anomalies chromosomiques embryonnaires.

## **Preimplantation Genetic Screening**

Comme énoncé ci-dessus, il est connu que le taux d'aneuploïdie embryonnaire dans l'espèce humaine est très élevé et que l'euploïdie est un des facteurs clés d'implantation embryonnaire, même si certaines formes de trisomie sont viables. De plus l'aneuploïdie embryonnaire est à l'origine de nombreuses fausses-couches précoces, allonge donc le temps nécessaire à l'obtention d'une grossesse et augmente avec l'âge maternel. A partir de cette idée, plusieurs outils de diagnostic rapide de la ploïdie embryonnaire, appelés Preimplantation Genetic Screening (PGS), ont été développés et sont utilisés en routine dans les laboratoires de biologie de la reproduction des pays autorisant ces techniques. Dans l'ensemble des cas, une biopsie embryonnaire est nécessaire afin d'accéder au matériel nucléaire embryonnaire. Ces biopsies embryonnaires peuvent être réalisées au troisième jour de développement lors du stade 8 cellules par prélèvement d'un ou deux blastomères ou au cinquième jour de développement par excision d'un fragment du trophoctoderme. L'hybridation in situ (FISH) des chromosomes dont une anomalie de nombre est souvent impliquée dans les fausses couches précoces a été premièrement réalisée sur au moins deux blastomères d'embryons biopsiés au troisième jour de développement. De par le peu d'anomalies détectées et donc le manque de sensibilité de cette technique, la FISH a progressivement été abandonnées au profit de l'hybridation génomique comparative ou array comparative genomic hybridization (array CGH), du single-nucleotide polymorphism array (SNP array) (22) et plus récemment de la qPCR et du NGS (next generation sequencing).

Le CHG array et le SNP, deux techniques pour lesquelles la biopsie est habituellement réalisée au stade de blastocyste bien qu'elles aient été validées sur prélèvement d'un seul blastomère au stade 8 cellules, ont de plus l'avantage de pouvoir mettre en évidence la présence de statuts chromosomiques de type mosaïque.

Le CGH array consiste en une amplification de l'ADN total avant marquage par deux fluorochromes différents (Cy3 et Cy5) puis hybridation sur plaque.

De son côté, le SNP compare, après amplification, le signal de chaque position entre l'ADN embryonnaire et un ADN témoin, permettant ainsi de mettre en évidence des anomalies d'équilibre chromosomique en même temps que la réalisation d'un génotypage embryonnaire. Son avantage principal est la possibilité de mettre en évidence des recombinaisons, une disomie parentale, l'origine parentale de

l'aneuploïdie et les translocations équilibrées. La limitation majeure à l'utilisation de cette méthode est le temps de rendu des résultats ne permettant pas un transfert embryonnaire dans le même cycle que la ponction.

Les techniques de qPCR sont également utilisées ont l'avantage d'être moins coûteuses et longues que les techniques précédentes. Ceci s'explique par l'absence de recours à une amplification totale du génome. En effet, une PCR multiplexe est réalisée afin de préamplifier 96 positions neutres dans le génome, 4 par chromosome. Chacune des 96 positions est ensuite quantifiée individuellement au cours d'une qPCR temps-réel. Les données sont ensuite normalisées par rapport à des données obtenues d'échantillons normaux. Des primers spécifiques peuvent également être ajoutés à la réaction, permettant ainsi de détecter des anomalies monogéniques, des délétions de petite taille, des translocations déséquilibrées.

Plus récemment, de nouvelles techniques de séquençage, appelées Next Generation Sequencing (NGS), ont été développées et ont une sensibilité suffisante pour être réalisées sur cellule unique. Une PCR multiplexe permet l'amplification du matériel génétique à séquencer, puis l'ensemble des séquences amplifiées est aligné sur une séquence de référence.

De nombreuses études ont porté sur le PGS et ont cherché à justifier son utilisation. Il a alors été montré que la sélection des embryons à transférer par la morphologie couplée au screening chromosomique réduisait le délai nécessaire à l'obtention d'une grossesse, évitait des transferts inutiles d'embryons, évitait la congélation d'embryons non viables et diminuait les risques de fausse-couche. Il est de plus, bien déterminé que la ploïdie embryonnaire et la morphologie, qu'elle soit précoce ou tardive ne sont pas corrélées. (23)

Le PGS étant strictement interdit en dehors du Diagnostic Pré-Implantatoire (DPI) en France, il apparaît primordial de mettre en évidence des marqueurs non invasifs de viabilité embryonnaire, prédictifs du potentiel implantatoire embryonnaire et de la ploïdie embryonnaire. De plus, le transfert de blastocystes euploïdes n'est pas la garantie de la naissance d'un enfant. Les processus liés à la grossesse et son bon déroulement ne peuvent en effet pas être limités à la ploïdie embryonnaire. Cela suggère l'existence de facteurs additionnels importants pour le potentiel implantatoire embryonnaire. C'est également à partir de ce constat qu'est apparu le concept d'utérus

en tant que détecteur de la qualité embryonnaire, autorisant ainsi ou non l'implantation du blastocyste cherchant à l'envahir.

### **Analyse de la physiologie embryonnaire et mise-en-évidence de nouveaux marqueurs**

Les milieux de culture embryonnaires humains utilisés actuellement dans les laboratoires d'AMP sont le reflet de recherches ayant portées sur la composition en nutriments le long d'oviductes de souris au cours du trajet embryonnaire depuis la fécondation jusqu'à l'implantation (24) (25). Contrairement à la situation in-vivo dans laquelle le microenvironnement embryonnaire évolue tout le long du développement préimplantatoire, les milieux de culture in-vitro représentent un environnement fixe dans lequel l'embryon évolue et s'adapte aux variations de composition résultant de son propre métabolisme. Ainsi, en connaissant la composition initiale d'un milieu de culture, et en la comparant à la composition de ce même milieu de culture après culture d'un embryon pendant plusieurs jours, la différence de composition observée serait le reflet du métabolisme de l'embryon. Basées sur l'idée que la qualité du métabolisme embryonnaire pouvait être corrélée à sa viabilité, des études ont cherché à identifier des différences dans plusieurs aspects de la composition des milieux de culture avant transfert embryonnaire pouvant expliquer le potentiel implantatoire d'un embryon.

#### Metabolomique

La métabolomique est définie par l'étude de l'ensemble des métabolites (sucres, acides-aminés, acides gras) impliqués dans les processus cellulaires. La spectroscopie proche infra-rouge (SPIR) est la technique ayant été la plus utilisée pour la caractérisation métabolomique des milieux de culture embryonnaire. Cette technologie est en effet suffisamment sensible pour permettre l'acquisition de spectres métabolomiques précis de milieu de culture embryonnaire d'embryons uniques et a été utilisée afin d'élaborer des algorithmes de sélection embryonnaire basés sur leur spectre métabolomique et corrélés à la viabilité embryonnaire (26). Des scores de sélection embryonnaires ont initialement été publiés et semblaient corrélés de façon satisfaisante avec l'issue des tentatives d'AMP. De plus, il a été montré que deux

embryons de morphologie comparable pouvaient avoir des spectres très différents, renforçant l'idée que la morphologie embryonnaire n'est pas forcément le reflet de la physiologie de l'embryon. Cependant ces algorithmes n'ont pas été validés lors d'études prospectives (27), des variations de profils dues au matériel utilisé différent d'un centre à l'autre semblant être à l'origine de ces différences de résultats. De plus, il semblerait qu'une partie des éléments ayant servis à la classification seraient liés au bruit de fond plus qu'au signal réellement. Face à ces problématiques, la SPIR n'a plus fait l'objet d'étude ces dernières années.

Plus récemment, deux nouvelles études ont porté sur l'analyse des profils métabolomiques de milieux de culture embryonnaire à l'aide de la spectrométrie de masse avec ionisation par électrobulbation (28) et spectrométrie de masse avec injection directe (29). Ces données prometteuses doivent cependant être confirmées par des études prospectives et randomisées.

Métabolites spécifiques

### Rappels sur le métabolisme embryonnaire pré-implantatoire

Très peu de données existent sur le métabolisme embryonnaire humain et la plupart des éléments connus sont l'adaptation directe des processus observés sur des expériences animales. Les connaissances actuelles se rapportent de plus à des travaux assez anciens.

Depuis les débuts de l'AMP, des équipes se sont intéressées aux dosages de métabolites variés dans le milieu de culture embryonnaire, reflets possibles de la viabilité embryonnaire. Les métabolites ayant été les plus étudiés sont le couple glucose-lactate et les acides aminés. Pendant les premiers stades du développement embryonnaire, le métabolisme énergétique est caractérisé par l'oxydation des acides carboxyliques que le pyruvate et le lactate. Le glucose est très peu consommé à ce stade de par une glycolyse inhibée mais au stade morula, après activation de génome embryonnaire, le glucose devient le substrat énergétique majoritaire par activation de la voie glycolytique, d'où la forte augmentation de la production de lactate observée au stade blastocyste. Cette modification du métabolisme énergétique embryonnaire correspond à une adaptation embryonnaire aux variations environnementales auxquelles il est soumis au cours de son trajet dans le tractus génital féminin, avec

notamment un gradient en oxygène allant de 20% d'O<sub>2</sub> au niveau de l'ampoule jusqu'à une hypoxie importante dans la cavité utérine (30).

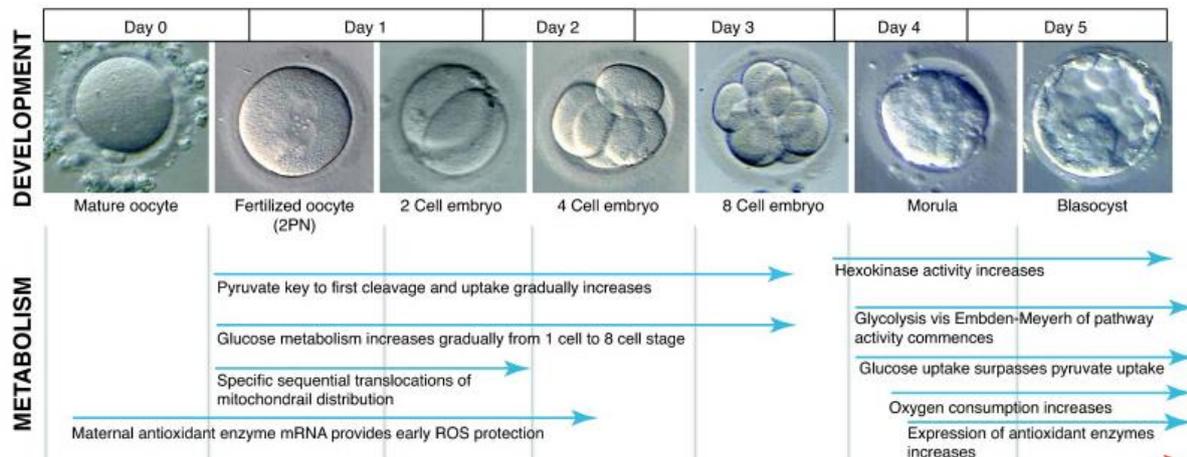


Figure 3 : Schéma récapitulatif des modifications métaboliques au cours du développement embryonnaire précoce in vitro. (Chason et al. 2011)

### Métabolisme du glucose

Le glucose en tant que substrat énergétique de l'embryon est étudié depuis des décennies et il est admis que sa présence est indispensable au développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste. Depuis la fin des années 80, des études ont cherché à mettre en évidence un possible lien entre la consommation embryonnaire de glucose et l'aptitude embryonnaire à être à l'origine d'une grossesse évolutive. Ainsi en 1987, Gardner et Leese (31) ont mesuré la consommation de glucose dans le milieu de culture de blastocystes de souris avant le transfert ont montré une consommation de glucose plus importante par les blastocystes qui s'étaient implantés que par ceux n'ayant pas donné de grossesse. Ces résultats ont été confirmés chez la souris par Gardner et Lane de façon prospective en utilisant la consommation glucidique comme critère de sélection avant le transfert (32). La même équipe publia plus récemment des données portant sur la relation entre métabolisme glucidique et développement embryonnaire dans l'espèce humaine : la consommation de glucose d'embryons humains au quatrième jour de développement était deux fois supérieure pour les embryons atteignant le stade blastocyste que pour les autres (33) et que les embryons à l'origine d'une grossesse consommaient plus de glucose aux quatrième et cinquième jours de développement in vitro que ceux qui ne s'implantaient pas (34). Ces données ont également permis de mettre en évidence une consommation accrue

de glucose de la part des embryons de sexe masculin par rapport aux embryons de sexe féminin, confirmant des publications portant sur d'autres espèces. Les auteurs ont également décrit une meilleure corrélation entre l'utilisation glucidique et la grossesse qu'entre morphologie embryonnaire et grossesse.

Les méthodes de dosage du glucose utilisées habituellement dans les laboratoires de biologie médicale ne sont malheureusement pas assez sensibles pour détecter des variations infimes de la consommation glucidique dans le milieu de culture embryonnaire. Seuls quelques laboratoires équipés de microfluorimétrie quantitative sont à l'origine de la majeure partie des publications à ce sujet.

### Acides Aminés

Le « turnover » des acides aminés par des embryons cultivés in vitro a également fait l'objet d'une recherche importante. Une première étude (35) a observé une différence d'utilisation des acides aminés entre les embryons se développant jusqu'au stade blastocyste et ceux n'atteignant pas ce stade. Une forte consommation embryonnaire de leucine semblait alors prédire la capacité embryonnaire à former un blastocyste. Une tendance équivalente existait pour d'autres acides aminés tels que l'alanine, l'arginine, la glutamine, la méthionine et l'asparagine. Brison et al. (36) ont également observé, après dosage dans le milieu de culture d'embryon au stade 2 cellules, qu'une plus grande consommation de leucine, asparagine et glycine était associée avec de meilleures chances de grossesse et de naissance vivante.

Ces deux études princeps ont de plus soumis l'hypothèse que les embryons se développant de façon optimale étaient l'objet d'un turnover global des acides aminés plus faible que pour les embryons non viables et donc qu'un métabolisme embryonnaire à bas bruit était le synonyme de bonne qualité embryonnaire (37). Cependant, la publication d'articles allant à l'encontre de cette dernière hypothèse (38) ne permet actuellement pas de statuer sur l'utilisation des acides aminés comme marqueurs de la viabilité embryonnaire.

### Protéomique

Le protéome consiste en l'ensemble des protéines synthétisées par l'embryon au cours de son développement et, étant dérivé du transcriptome embryonnaire, serait

le reflet du fonctionnement cellulaire. Une partie de ce protéome, appelée le sécrétome, est expulsée dans le milieu de culture embryonnaire. Son intérêt principal en regard de l'étude du transcriptome qui nécessite une extraction de l'ARN-messager est sa facilité d'accès puisqu'il peut être étudié de manière non invasive par analyse du milieu de culture embryonnaire. Cette étude n'est en revanche possible qu'en culture prolongée, la transcription embryonnaire ne débutant qu'après activation du génome embryonnaire autour du stade 8 cellules.

La majeure partie des publications s'intéressant à l'étude du sécrétome embryonnaire utilisent la spectrométrie de masse. Ainsi Katz-Jaffe et al. (39) décrivent, après analyse en SELDI-TOF MS de milieux de culture embryonnaire, la présence d'une protéine de 8.5KD dont la quantité était corrélée avec le bon développement de blastocystes humains. Cette protéine fut ensuite isolée et analysée par spectrométrie de masse en tandem et séquençage protéique et semblerait correspondre à l'ubiquitine. De la même façon, l'hCG (40), l'Apolipoprotéine-A1 (41), le human leukocyte antigen G (42), le granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (43) ou l'interféron  $\alpha 2$  (44) ont été comme étant de possibles marqueurs corrélés à l'implantation embryonnaire et détectables dans le milieu de culture embryonnaire.

D'autre part, la spectrométrie de masse a permis une meilleure transparence quant à la composition des milieux de culture commerciaux utilisés dans la totalité des laboratoires d'AMP et dont la recette restait connue que des industriels. Ainsi, Dyrlund et al. (45) a confirmé la présence d'albumine humaine en tant que protéine majoritaire mais également de nombreuses protéines d'origine humaine et pouvant impacter le développement embryonnaire, telles que des cytokines ou des facteurs de croissance.

Cette connaissance de la composition de base des milieux de culture est primordiale d'autant plus que la principale limitation technique de l'utilisation de la spectrométrie de masse dans le cadre de l'analyse du sécrétome embryonnaire, en plus de la limitation de volume, est la composition même des milieux utilisés en FIV. En effet, l'albumine étant majoritaire et ne pouvant pas être extraite, elle exerce un effet masque sur la composition réelle du milieu en dissimulant la présence de protéines ou peptides présents en très faible quantité par manque de sensibilité de la technologie utilisée. L'albumine est de plus une protéine de transport très importante et pourrait dissimuler l'existence de protéines ou peptides ne pouvant être présents que sous forme liée.

Une autre approche consiste en l'utilisation de puces à protéines pouvant contenir jusqu'à 120 anticorps différents (46). Pour autant, cette technologie est peu utilisée de par son coût élevé et la nécessité de sélectionner un panel d'anticorps, donc de soupçonner la présence de la protéine recherchée.

### Acides nucléiques circulants

A l'heure actuelle, deux types d'acides nucléiques circulants ont été identifiés : l'ADN libre et les micro-ARNs.

L'ADN libre correspond à des molécules d'ADN double brin présentes sous la forme de courts ou longs fragments dans l'organisme. Ils proviennent du relargage d'ADN mitochondrial et/ou nucléaire lors des phénomènes apoptotiques ou nécrotiques.

Les micro-ARNs (miRs) sont de courtes séquences (20-22 nucléotides), très conservées dans les espèces, et qui régulent l'expression d'environ la moitié des gènes du génome humain (47). Les miRs matures agissent en s'appariant à des séquences d'ARNm complémentaires, inhibant ainsi la traduction en protéine ou amenant à la destruction de cet ARNm. Les miRs peuvent être sécrétés dans le milieu extérieur des cellules de par leur présence dans les exosomes.

Plusieurs publications ont déjà démontré le rôle indispensable des miRs dans le processus de développement embryonnaire chez plusieurs espèces, allant de *Caenorhabditis elegans* aux mammifères, ainsi que dans les différentes étapes de reprogrammation cellulaire vers les cellules souches pluripotentes. Chez la souris, une délétion du gène codant pour l'endonucléase Dicer1, une nucléase indispensable pour la formation des miRs, est responsable d'un arrêt de développement embryonnaire entre le sixième et huitième jour de développement embryonnaire (48). Des études récentes ciblant des groupes spécifiques de miRs en fonction des gènes régulés ont mis en évidence l'existence de familles de miRs indispensables au développement embryonnaire et à la gamétogénèse (49) (50). Rosenbluth et al. (51) ont étudié l'expression de 754 miRs dans 14 blastocystes humains (5 blastocystes femelles, 4 mâles et 5 aneuploïdes). Ils ont ensuite confirmé par PCR quantitative en temps-réel le degré d'expression des miRs les plus abondants dont miR-372, miR-720, miR-302c

dans 27 blastocystes. Ces miRs avaient déjà été documentés dans d'autres espèces et semblent impliqués dans les processus de développement embryonnaire et les cellules souches pluripotentes. La même équipe a ensuite décrit la présence de miRs dans le milieu de culture embryonnaire ou ils semblent différemment exprimés en fonction de la technique d'insémination, le statut chromosomique et les chances de grossesse (52). Des miRs ont également été détectés dans le milieu de culture d'embryons bovins (53). Ces résultats suggèrent une potentielle utilisation des miRs comme marqueurs non invasifs prédictifs de l'implantation embryonnaire.

De plus, les miRs semblent également jouer un rôle dans la réceptivité endométriale, facteur majeur à prendre en compte dans le processus d'implantation embryonnaire (54).

La présence d'ADN libre dans le liquide folliculaire de patientes prises en charge en AMP a récemment été mise en évidence (55). Il a été montré une corrélation négative entre la quantité d'ADN libre dans le liquide folliculaire et la taille des follicules illustrant ainsi la probable prépondérance des phénomènes apoptotiques au sein des petits follicules non matures comparativement à ceux de grande taille matures. L'ADN libre dans le liquide folliculaire pourrait se révéler être un bon marqueur de qualité ovocytaire mais également embryonnaire. Il semblerait en effet que la présence de taux élevés d'ADN libre dans le liquide folliculaire soit également corrélée à un mauvais score morphologique embryonnaire au troisième jour de développement. Ces données préliminaires doivent cependant être confirmées par des études à plus grande échelle.

### Combinaison / association de marqueurs

Face à l'absence actuelle d'un marqueur non invasif corrélé à la viabilité et au potentiel implantatoire embryonnaire, l'idée qu'un seul marqueur ne pouvait pas être assez spécifique a été suggérée et le développement d'algorithmes prenant en compte différents types de paramètres dans l'arbre décisionnel semble aujourd'hui l'axe à

suivre. Un des exemples les plus récents est ainsi représenté par une association entre l'algorithme morphocinétique de Meseguer et le dosage de l'IL-6 dans le milieu de culture embryonnaire de blastocystes avant le transfert (figure 4) (56). Cette première étude, malgré un faible effectif analysé, démontrait l'intérêt de la combinaison de marqueurs, ici morphocinétiques et biochimiques, dans la sélection embryonnaire avant le transfert de par de meilleurs taux d'implantation embryonnaire en comparaison de l'utilisation de l'algorithme morphocinétique seul et cela en restant non invasif. Ces données doivent être confirmées par des études prospectives portant sur de plus larges effectifs.

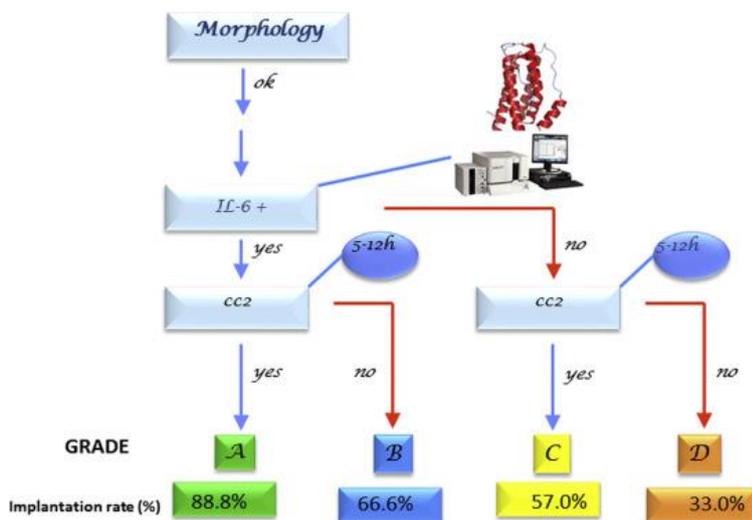


Figure 4 : Arbre décisionnel basé sur les paramètres morphocinétiques embryonnaires et la présence d'IL-6 dans le milieu de culture embryonnaire tel que décrit par Dominguez et al. 2015. Les taux d'implantation pour chaque grade sont également présentés.

## OBJECTIFS

---

En l'absence d'un biomarqueur non-invasif universellement reconnu comme prédictif de la qualité et du potentiel implantatoire embryonnaire au cours d'une fécondation in-vitro, ce travail a pour objectif la réanalyse des données de la littérature et la recherche de nouveaux types de biomarqueurs.

Concernant l'existence d'un marqueur morphocinétique, les données issues de la culture en routine au laboratoire d'AMP du CHU de Nantes dans l'Embryoscope ont permis la réanalyse rétrospective des paramètres publiés dans la littérature.

En parallèle, une banque de milieux de cultures embryonnaires d'embryons transférés au stade blastocyste a été constituée dans le but de la recherche de biomarqueurs moléculaires identifiables dans ces milieux de culture. Ces marqueurs pouvant être issus de différents processus impliqués dans la vie cellulaire et embryonnaire, ce travail s'est intéressé aux paramètres suivants :

- Etude du métabolisme énergétique embryonnaire par dosage du glucose et du lactate à l'aide de bandelettes de dosage rapide
- Recherche de la présence de micro-ARNs d'origine embryonnaire par RT-qPCR
- Recherche de l'existence d'un biomarqueur protéique par immuno-dosage multiplexe

Les résultats des différents dosages étaient rapportés aux issues des tentatives de FIV afin de pouvoir mettre en évidence une corrélation entre la présence de ces marqueurs et le potentiel implantatoire de l'embryon cultivé dans le milieu dosé.

## **MATERIELS ET METHODES**

---

## **Etudes rétrospective de la base de données de l'Embryoscope**

Huit paramètres morphocinétiques (57) récemment décrits dans la littérature comme potentiellement corrélés aux chances d'implantation embryonnaire ont été rétrospectivement appliqués à une partie de notre base de données correspondant à 342 embryons transférés de façon unique. Ces embryons étaient issus de prise en charge en ICSI et ont été mis en culture dans l'Embryoscope® entre février 2011 et juillet 2014. Chaque embryon avait alors été prospectivement annoté avant d'être transféré. Le caractère prédictif de l'implantation embryonnaire, définie par un dosage sanguin de  $\beta$ -hCG positif deux semaines après le transfert embryonnaire, a été testé pour chacun des paramètres suivants :

- la disparition des pronucléi,
- la durée du stade 2 cellules inférieure à 11.9 heures,
- la durée du stade 2 cellules supérieure à 5 heures,
- la durée du stade 3 cellules inférieur à 0.76 heures,
- la durée du troisième cycle cellulaire (passage de 3 à 5 cellules) comprise entre 9.7 et 21 heures,
- la durée jusqu'au stade 5 cellules comprise entre 48.8 et 56.6 heures,
- la durée jusqu'au stade 8 cellules et la durée jusqu'à l'initiation de la blastulation.

## **Identification de biomarqueurs dans le milieu de culture embryonnaire**

### Création d'une bio-collection de milieux de culture embryonnaires.

Dans le cadre de la recherche de biomarqueurs liés à l'implantation embryonnaire, une partie de ce travail a consisté à collecter les milieux de culture embryonnaires des embryons cultivés en routine au laboratoire de biologie de la reproduction du CHU de Nantes puis transférés ou congelés. Pour chacun de ces embryons, le milieu G1 plus a été collecté au troisième jour de développement lors du changement de milieu, alors que le milieu G2 plus était collecté immédiatement avant le transfert embryonnaire ou la vitrification. L'ensemble des échantillons a été conservé à -80°C. Pour chaque embryon transféré, l'issue de la prise en charge en AMP était

connue et répertoriée après anonymisation du couple. Cette biocollection de milieux de culture embryonnaire a servi au dosage du glucose et lactate, à la recherche de miRNA et au dosage multiplexe de protéines.

#### Etude du métabolisme embryonnaire à la recherche d'un biomarqueur dans le milieu de culture embryonnaire

Le dosage du glucose et du lactate, a été réalisé à l'aide de bandelettes réactives électrochimiques et de lecteurs rapides (StatTrip, Nova), habituellement utilisés pour le suivi des patients diabétiques et des sportifs. Les dosages du glucose et du lactate sont enzymatiques et reposent sur le principe de la glucose déshydrogénase et la lactate oxydase. La détection des électrons libérés au cours de ces réactions permet la quantification. Après passage des contrôles, 1,2µL de chaque milieu G1 et G2 décongelés sur glace et correspondant au même embryon étaient déposés sur la bandelette et le résultat était directement lu sur le lecteur. Les échantillons ont été dosés en duplicate.

#### Recherche de micro-ARN dans le milieu de culture embryonnaire.

Seize milieux de culture embryonnaire congelés d'embryons transférés ont subi une étape d'extraction phénol chloroforme de l'ARN additionnée d'un passage sur des colonnes d'affinité (Mirneasy, QIAGEN). Pour chaque embryon, les milieux G1 et G2 ont été traités et élués 2 fois. La qualité de l'extraction de l'ARN total était évaluée par dosage spectrophotométrique sur Nanodrop.

Après récupération des 32 éluats issus de la purification, de volume 12 µL chacun, une étape de reverse-transcription utilisant le Hi-Spec buffer du kit miScript II RT kit (Qiagen) a précédé la qPCR avec le kit miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) comme indiqué sur la figure 5. Il a été choisi dans un premier temps de rechercher les mir-25 (58) et mir-191 (52), décrits comme présents dans le milieu de culture embryonnaire dans la littérature, afin de mettre au point la technique. Des primers spécifiques de ces deux miRNA ont été utilisés (miScript primers assay, Qiagen). La qualité de l'amplification était évaluée par visualisation des courbes de fusion. Les

produits de PCR subissaient ensuite une migration par électrophorèse capillaire sur Calliper afin de vérifier la taille des séquences amplifiées.

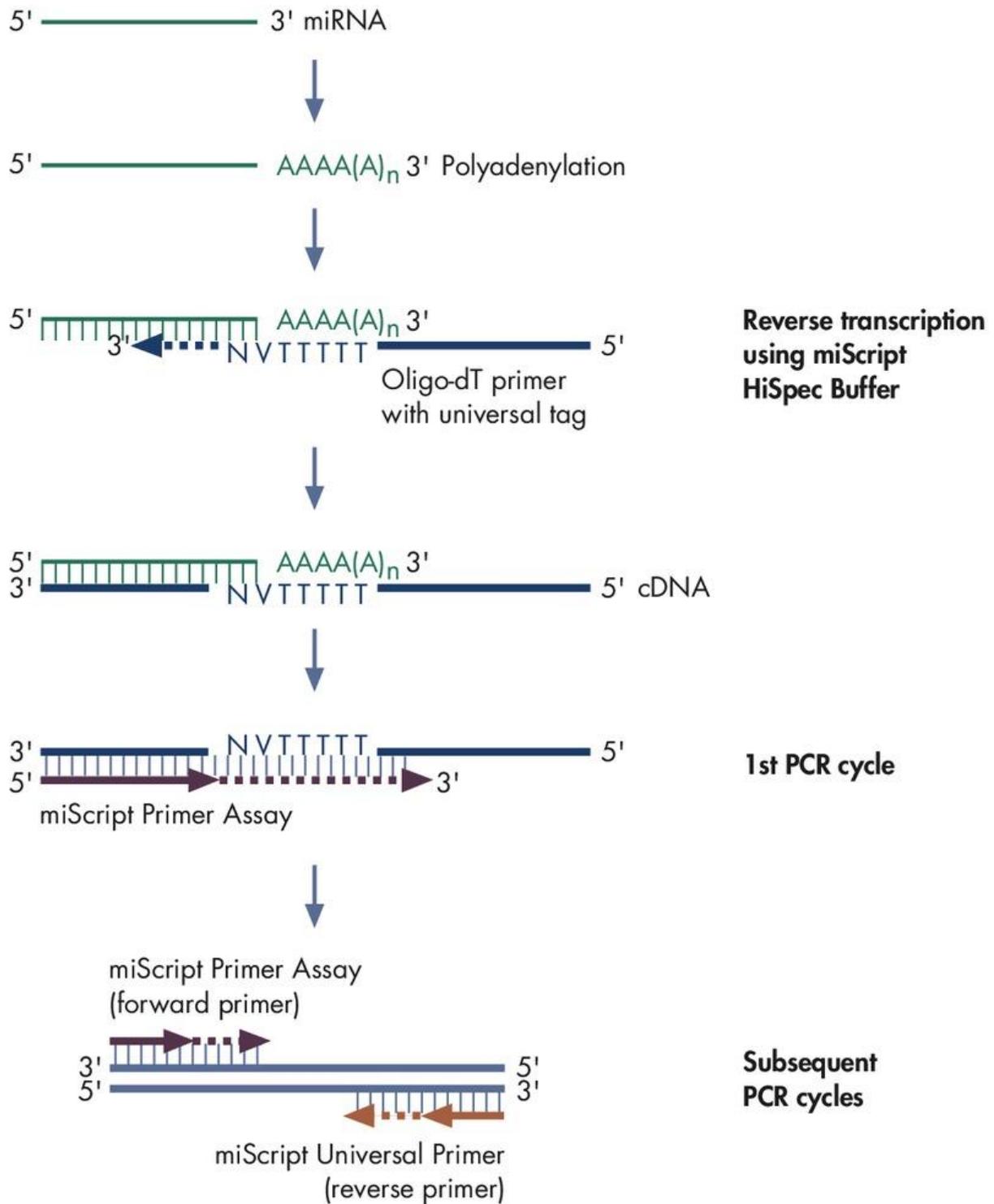


Figure 5 : Principe de la recherche de micro-ARNs par RT-qPCR avec le kit miScript Primers Assay (QIAGEN)

## Recherche de marqueur protéique par immunodosage

L'analyse de données de transcriptomique réalisée sur cellules uniques de blastocystes et issues de travaux en cours par notre équipe de recherche (INSERM UMR 1064, ITUN) et portant sur l'identification de signatures moléculaires spécifiques de chacune des trois lignées cellulaires composant le blastocyste humain (Epiblaste, Endoderme primitif et trophoctoderme) a permis de cibler la recherche d'un potentiel marqueur protéique prédictif de viabilité embryonnaire sur 6 protéines : BMP-2, BMP-4, IL6, SCF, Cripto-1 et GDF-15. En effet, la présence des transcrits correspondant à ces protéines en grande quantité dans les cellules issues du trophoctoderme et leur plus faible expression dans les cellules de l'épiblaste ou de l'endoderme primitif suggèrent la possible implication de ces protéines dans les processus implantatoire et leur présence possible dans le milieu de culture embryonnaire. Afin de limiter le volume utilisé pour le dosage de chaque protéine, un dosage multiplex par immuno-dosage a été réalisé à l'aide de la technologie Luminex<sup>®</sup> et le kit Luminex<sup>®</sup> Magnetic Screening Assays (R&D systems). La Technologie Luminex<sup>®</sup> est une technologie qui, fondée sur le principe de la cytométrie en flux, allie l'utilisation de microsphères fluorescentes et une double lecture après excitation par deux lasers (59) (Figure 6).

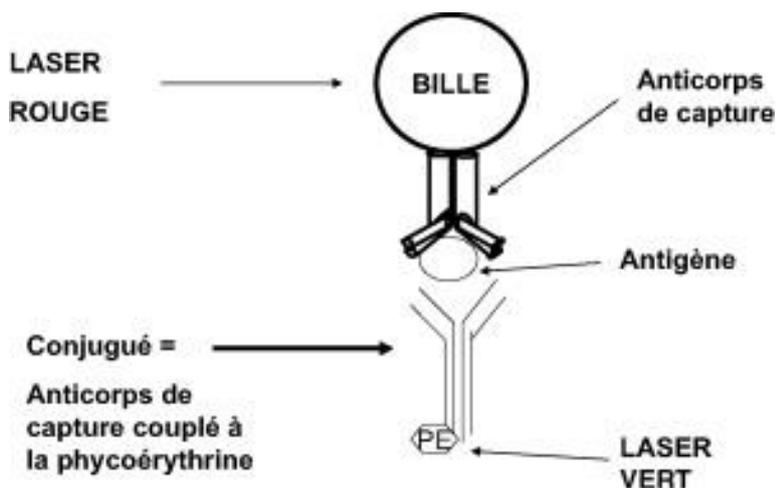


Figure 6 : Principe de la technologie Luminex

Quarante milieux de culture prolongée embryonnaires (G2 Plus, Vitrolife, Suède) prélevés juste avant le transfert ou la vitrification embryonnaire et dont l'issue de tentative est connue ont ainsi été analysés en duplicate après congélation. Les embryons correspondant à ces milieux ont tous été transférés un par un soit dans le même cycle que la ponction ovocytaire ou alors après vitrification au cours d'un autre cycle. Ainsi, 16 milieux correspondaient à des embryons ayant donné lieu à une grossesse clinique (définie par l'existence d'une activité cardiaque fœtale à l'échographie) et 24 milieux correspondaient à des embryons ne s'étant pas implantés (dosage de  $\beta$ -hCG négatif 15 jours après le transfert embryonnaire). Un milieu vierge de toute culture embryonnaire a également été analysé. Une gamme de standards poolés pour chaque analyte a été réalisée en six points de dilution à partir de standards concentrés ainsi qu'un blanc à partir du diluent fourni dans le kit de dosage comme indiqué dans les recommandations du fournisseur.

### **Méthodologie statistique**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Le test t de Student a été utilisé pour comparer les résultats des dosages de glucose et lactate dans les milieux de culture embryonnaire. Le test t de Student et le test du  $\chi^2$  ont été utilisés pour l'étude des différents paramètres morphocinétiques. Pour toutes les analyses, une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

## RESULTATS

---

## **Analyse de la base de données de l'Embryoscope**

Le caractère prédictif de l'implantation embryonnaire de huit paramètres morphocinétiques décrits dans la littérature (57) comme prédictifs de l'implantation embryonnaire a été analysé sur la base de données de l'Embryoscope du laboratoire de biologie de la reproduction du CHU de Nantes. Aucun de ces paramètres n'a montré de caractère prédictif de l'implantation embryonnaire lorsqu'appliqué à notre base de données (Tableau1). Ces résultats renforcent donc le caractère centre-dépendant de l'annotation embryonnaire et l'absence de consensus existant quant au paramètre à utiliser en routine.

Taille de l'échantillon

Critère

prédicatif utilisé

Effectif BhCG + selon le critère

Effectif BhCG - selon le critère

Statistique

342 embryons	 Disparition des pronuclei	10 embryons < 20,45h 126 embryons ≥ 20,45h Moyenne: 25,10h	11 embryons < 20,45h 195 embryons ≥ 20,45h Moyenne: 25,60h	P = 0,4939
336 embryons	 Durée du stade 2 cellules (<11,9h)	80 embryons < 11,9h 55 embryons ≥ 11,9h Moyenne: 11,39h	96 embryons < 11,9h 105 embryons ≥ 11,9h Moyenne: 11,62h	P = 0,0503
336 embryons	 Durée du stade 2 cellules (>5h)	131 embryons > 5h 4 embryons ≤ 5h Moyenne: 11,39h	188 embryons > 5h 13 embryons ≤ 5h Moyenne 11,62h	P = 0,1507
182 embryons	 Durée du stade 3 cellules (<0,76h)	30 embryons < 0,76h 38 embryons ≥ 0,76h Moyenne: 2,38h	37 embryons < 0,76h 77 embryons ≥ 0,76h Moyenne: 3,44h	P = 0,1559
323 embryons	 Passage de 3 cellules à 5 cellules entre 9,7 et 21h	9,7h < 115 embryons < 21h 14 embryons ≤ 9,7h or ≥ 21h Moyenne 13,43h	9,7h < 163 embryons < 21h 31 embryons ≤ 9,7h or ≥ 21h Moyenne: 13,04h	P = 0,1925
330 embryons	 Délai jusqu'à 5 cellules(48,8-56,6 h)	48,8h < 62 embryons < 56,6h 68 embryons ≤ 48,8h or ≥ 56,6h Moyenne: 52,30h	48,8h < 85 embryons < 56,6h 115 embryons ≤ 9,7h or ≥ 21h Moyenne: 52,06h	P = 0,3538
257 embryons	 Délai jusqu'à 8 cellules(48,8-56,6 h)	114 embryons Moyenne 57,99h	143 embryons Moyenne 59,04h	P = 0,1768
36 embryons	 Temps de blastulation	6 embryons < 96,2h 7 embryons ≥ 96,2h Moyenne: 100,19h	6 embryons < 96,2h 17 embryons ≥ 96,2h Moyenne 105,99h	P = 0,3905

Tableau 1 : Résultats de l'analyse rétrospective de la base de données de l'Embryoscope® du CHU de Nantes.

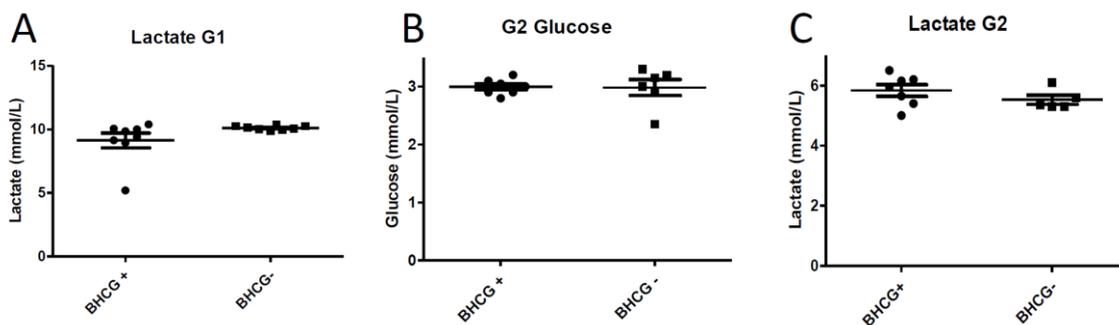
Huit paramètres morphocinétiques embryonnaires décrits comme prédictifs de l'implantation embryonnaire dans la littérature ont été appliqués aux données des embryons cultivés dans l'Embryoscope® et ayant bénéficié d'un transfert utérin. Un dosage positif de bhCG 15 jours après le transfert embryonnaire a été utilisé comme marqueur de l'implantation embryonnaire. Aucun de ces paramètres ne s'est révélé prédictif de l'implantation embryonnaire lorsqu'appliqué à notre base de données.

## Identification de biomarqueurs dans le milieu de culture embryonnaire

### Dosage du glucose et lactate

Le dosage du glucose et lactate a été effectué sur le milieu de culture de 16 embryons. Chaque mesure a été réalisée en doublon, le résultat présenté étant la moyenne des deux résultats pour chaque échantillon. La concentration de glucose dans le milieu de culture G1 était sous le seuil de détection de la technique (0.56 mmol/L). Probablement de par la présence d'huile minérale, utilisée lors de la culture embryonnaire, dans certains prélèvements, il a été impossible de doser le lactate ou glucose dans plusieurs échantillons. La figure 7 présente les résultats des dosages de glucose et lactate en fonction de l'issue des cycles de prise en charge en AMP. Il n'existe aucune différence statistique entre les valeurs des deux groupes, et ce peu importe le paramètre considéré. Face à ces résultats peu convaincants il été décidé de ne pas poursuivre le dosage de ces paramètres, la technique utilisée n'étant probablement pas adaptée à des variations de valeurs très faibles.

Figure 7 : Dosage du glucose et lactate dans les milieux de culture embryonnaire G1 et G2 (Vitrolife) d'embryons transférés à l'aide de bandelettes et lecteurs de dosage rapide (StatStrip) en fonction de l'implantation embryonnaire.



Recherche de micro-ARNS dans le milieu de culture embryonnaire

La concentration en ARN total après extraction était de  $10.91 \pm 7.22$  ng/ $\mu$ L pour chaque éluat. Après RT-qPCR, la présence de miRNA dans le milieu de culture embryonnaire n'a pu être montrée que sous forme de traces, avec des CT compris entre 30 et 37. Cependant, la migration des produits de PCR sur Caliper a suggéré la spécificité de l'amplification pour mir-191 pour certains échantillons. En revanche, la présence de mir-25, un miRNA décrit comme présent dans le milieu de culture de blastocystes bovins, n'a pas pu être retrouvée dans le milieu de culture des blastocystes humains (Figure 8).

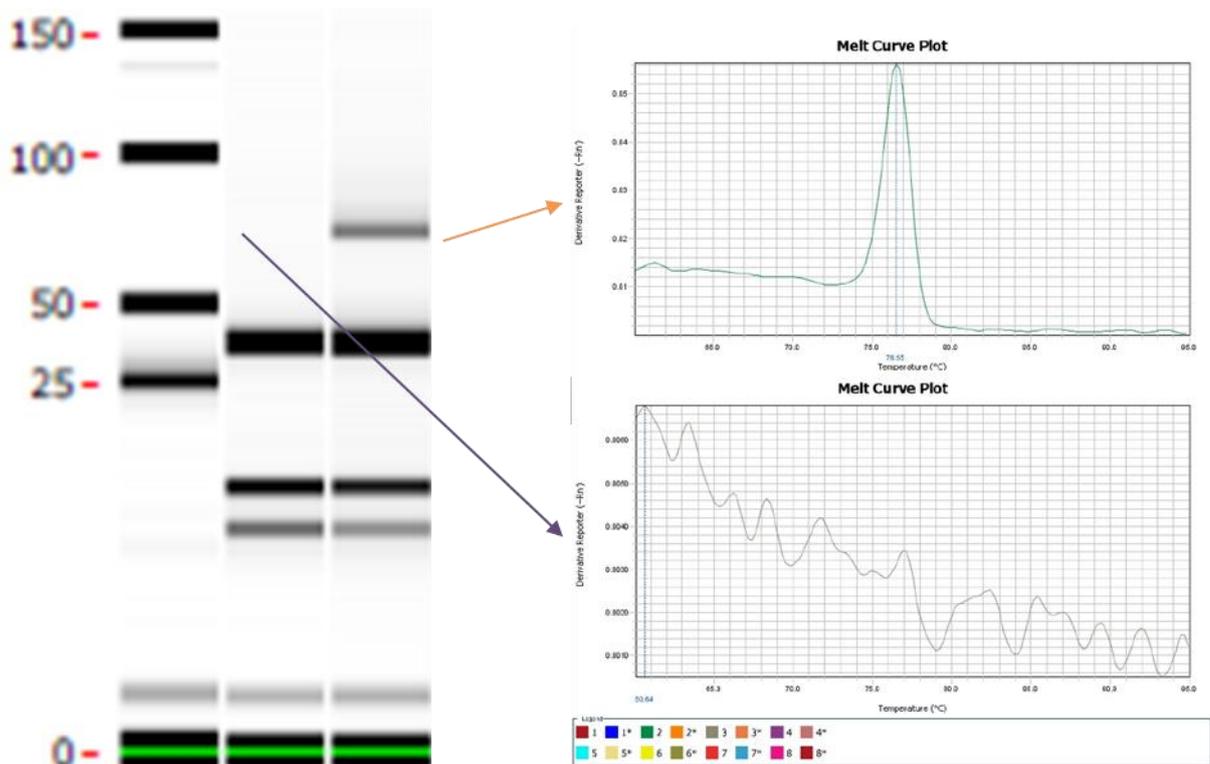


Figure 8 : Présentation des courbes de fusion et de la migration par électrophorèse capillaire (Caliper) d'un contrôle négatif (à gauche) et d'un échantillon (à droite) après RT-qPCR avec le kit miScript Primers Assay (QIAGEN) pour mir-191 dans un milieu de culture embryonnaire G2-Plus (Vitrolife) ayant servi à la culture d'un blastocyste humain transféré.

Recherche de marqueurs protéiques dans le milieu de culture

Pour chaque analyte recherché, chacun des points de la gamme dosé en duplicate a été validé. Les coefficients de variation étaient tous inférieurs à 15%. Les limites inférieures de quantification (LLOQ) pour chacun des paramètres étaient très basses, de l'ordre du fg/mL. Les valeurs exactes pour chaque paramètre sont indiquées sur la figure 9. Pour la totalité des échantillons analysés, le signal de fluorescence observé était inférieur aux seuils de quantification pour l'ensemble des paramètres dosés. En se basant sur la définition de la limite de détection comme étant égale à trois fois le signal du blanc, il apparaît même qu'aucun des paramètres recherchés ne soit détectable dans les milieux de cultures comme indiqué dans le tableau 2.

IL-6	SCF	BMP-2	Cripto-1	GDF-15	BMP-4
1,08	0,97	0,92	0,88	1,01	1,00

*Tableau 2 Moyenne des rapports du signal de fluorescence des 40 milieux de culture par rapport au signal de fluorescence du blanc pour chacun des paramètres recherchés*



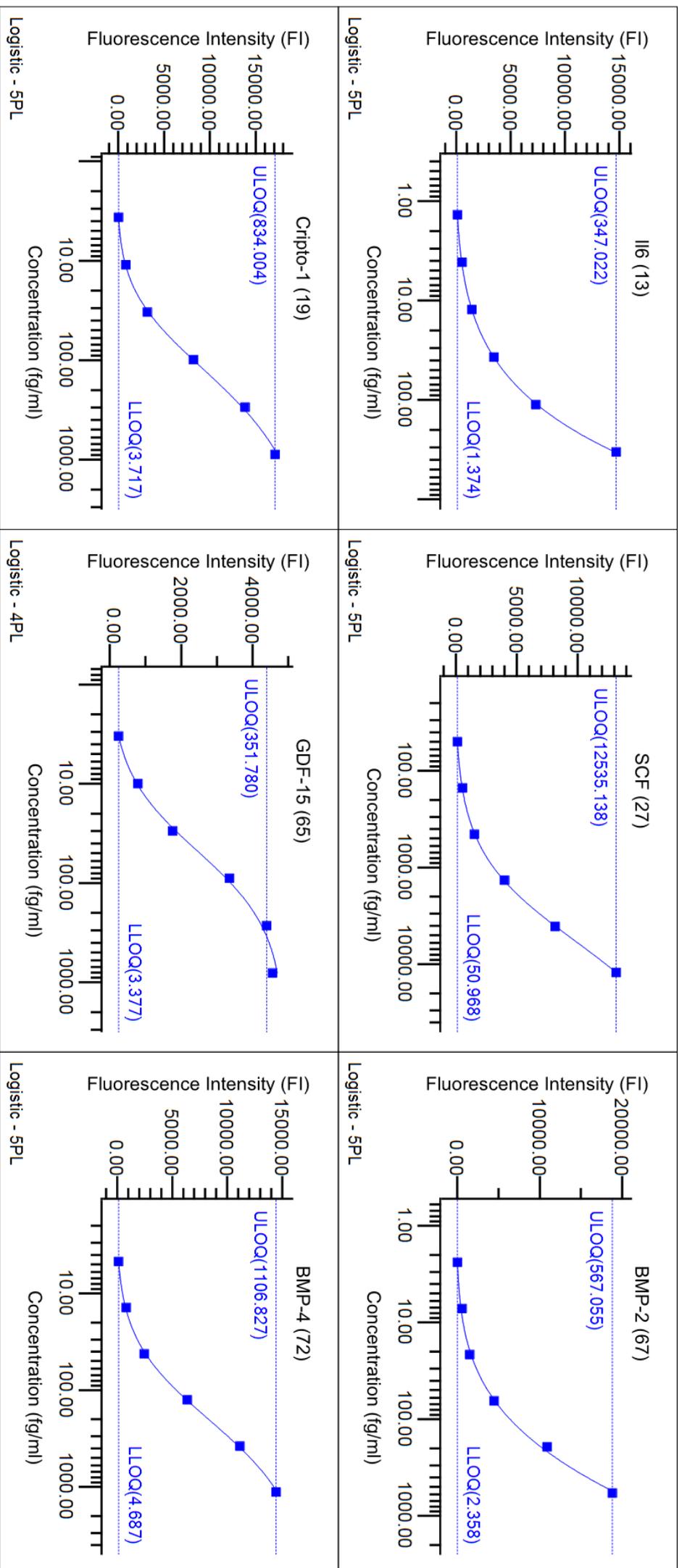


Figure 9 : Gamme de standards pour BMP-2, BMP-4, IIG, SCF, Cripto-1 et GDF-15 sur automate LumineX®. Chacun des points de gamme a été réalisé en duplicate. LLOQ correspond à la limite inférieure de quantification et ULOQ à la limite supérieure.

**DISCUSSION**

---

L'objectif de ce travail était la mise en évidence de biomarqueurs non invasifs de la qualité embryonnaire. Cependant, ni la transposition des paramètres morphocinétiques embryonnaires décrits dans la littérature sur notre base de données, ni la recherche de biomarqueurs dans les milieux de culture embryonnaire n'a su se montrer prédictifs de la qualité embryonnaire à lui seul.

### **Analyse rétrospective de la base de données de l'Embryoscope**

La transposition de marqueurs morphocinétiques du développement embryonnaire précoce décrits comme corrélés à l'implantation embryonnaire dans la littérature sur notre base de données n'a pas permis de retrouver des résultats similaires. L'Embryoscope est un système de culture et d'observation embryonnaire fermé permettant l'annotation et l'analyse dans le temps des différents événements et divisions cellulaires au cours du développement embryonnaire précoce lors d'une FIV. Depuis sa commercialisation dans les années 2000, d'autres systèmes du même type sont apparus sur le marché. En plus de l'avantage majeur de pouvoir observer le développement embryonnaire tout en préservant des conditions de culture optimales, l'enjeu majeur de ces systèmes réside en l'analyse de la morphocinétique embryonnaire, définie comme l'analyse des événements cellulaires embryonnaires en fonction du temps. L'analyse de la morphocinétique embryonnaire a alors été l'objet d'un nombre très élevé d'études à la recherche de l'identification d'un marqueur prédictif de la qualité embryonnaire et de son potentiel implantatoire. Ainsi plus de 140 publications sont répertoriées dans Pubmed après saisie des mots-clés « time lapse IVF ». Cependant, malgré ce nombre très élevé de publications, peu d'essais prospectifs randomisés existent à ce jour (14) (60) (16) (61), la majeure partie des autres publications correspondant à des études de faible ou moyen niveau de preuve scientifique. Malgré le nombre important de marqueurs morphocinétiques ou d'algorithmes basés en partie sur la morphocinétique embryonnaire ayant été décrits comme étant prédictifs de la blastulation, de l'euploïdie ou du potentiel implantatoire embryonnaire, ces marqueurs souffrent d'un manque de reproductibilité lorsqu'ils sont appliqués sur une cohorte embryonnaire différente de celle étudiée lors de ces essais. Ainsi aucun des paramètres rapportés à notre base de données embryonnaire ne s'est révélé prédictif de l'implantation embryonnaire à lui seul. Une des principales raisons

à l'absence évidente d'existence d'un marqueur morphocinétique réside dans l'observation d'écart-types très étendus pour chacun des paramètres analysés. Il devient alors difficile de déterminer une valeur seuil pour chacun de ces paramètres.

L'annotation embryonnaire souffre de plus d'un manque de standardisation entre les différentes équipes (15) malgré la publication d'une proposition de référence (62). Le développement de systèmes d'annotation embryonnaire automatisée permettrait de remédier à ces difficultés de standardisation. Le seul système automatisé actuellement sur le marché, appelé Eeva, ne permet pas une annotation jusqu'au stade blastocyste mais calcule un score de qualité embryonnaire à partir des évènements du développement précoce. En revanche, le type de milieu de culture utilisé ne semble pas significativement modifier les temps de développement embryonnaire (63).

Le point de départ à l'acquisition par le système time-lapse est souvent défini comme le moment de l'insémination. Dans le cas de l'ICSI, il est difficile de connaître le moment précis de l'injection du spermatozoïde pour chaque ovocyte et l'heure médiane d'injection de la cohorte ovocytaire est souvent choisie comme point de départ. On peut alors imaginer que dans le cadre de cohortes ovocytaires importantes avec en parallèle une sélection de spermatozoïdes à injecter difficile, notamment dans le cadre des prélèvements chirurgicaux ou en cas de cryptozoospermie très importante, il peut exister un délai assez conséquent entre l'injection du premier ovocyte et celle du dernier. Dans le cas de la FIV, le moment de l'insémination ne correspondant pas au moment de la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte, le point de départ à l'acquisition par le système time-lapse est donc relativement arbitraire. Ces approximations quant au point de départ de l'acquisition (64) peuvent possiblement expliquer une partie de la variabilité des valeurs morphocinétiques observées entre les équipes et au sein d'un même laboratoire. Pour remédier à cet inconvénient, il a été suggéré d'utiliser la disparition des pronuclei comme point de départ (65).

Cependant, l'observation de la totalité des évènements du développement embryonnaire a permis d'augmenter significativement la détection d'évènements anormaux par rapport à l'observation quotidienne des embryons. Ces évènements, tels que les anomalies de la fécondation, la présence de cellules multinucléées, les anomalies de clivage précoce ou les fusions cellulaires sont corrélées négativement

avec les chances d'implantation embryonnaire (14). L'utilisation des systèmes time-lapse permet donc une optimisation dans le choix de l'embryon à transférer et limite le nombre de transferts embryonnaires à faible potentiel implantatoire par désélection des embryons présentant ces anomalies de développement.

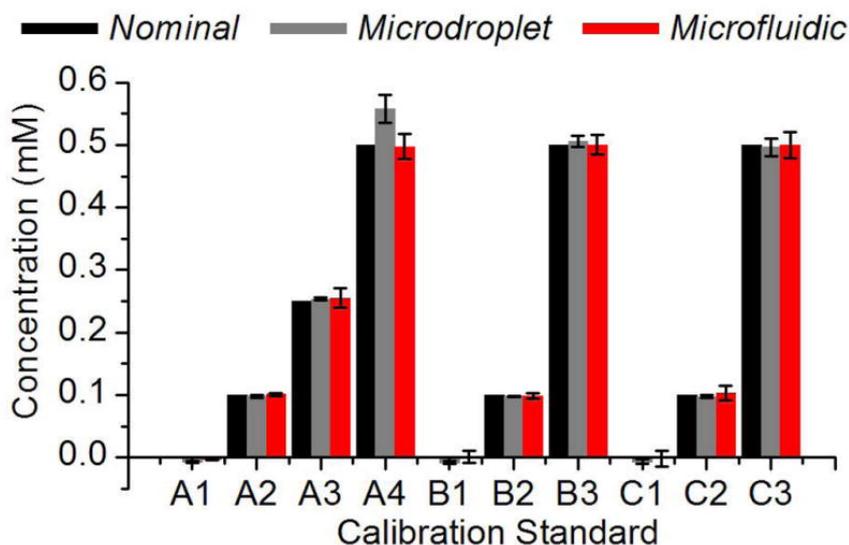
Dans l'attente d'études randomisées prospectives multicentriques et portant sur un grand nombre d'embryons analysés, il n'existe actuellement aucune certitude quant à l'utilisation de la morphocinétique embryonnaire comme critère exhaustif de sélection de l'embryon à transférer. L'utilisation des systèmes time-lapse garde toutefois un intérêt indiscutable de par l'optimisation des conditions de culture embryonnaire, une facilitation et une flexibilisation de l'observation morphologique embryonnaire et la mise en évidence des évènements anormaux du développement embryonnaire. Leur utilisation s'intègre de plus parfaitement dans les processus de qualité puisqu'ils permettent une facilitation des contrôles internes d'annotation et de sélection embryonnaire, un archivage du développement embryonnaire objectif et une réanalyse facilitée de chaque dossier. La morphocinétique embryonnaire ne peut donc pas à elle seule être utilisée dans les processus de sélection embryonnaire, mais son utilisation en complément de l'analyse morphologique classique permet une amélioration de la prise en charge globale.

## **Identification de biomarqueurs dans le milieu de culture embryonnaire**

### Analyse du métabolisme embryonnaire par le dosage du glucose et du lactate dans les milieux de culture embryonnaire

Le dosage du glucose et du lactate dans le milieu de culture d'embryons cultivés suite à une FIV présente un intérêt certain et connu depuis plusieurs années. Malgré l'existence de données scientifiques encourageantes sur la possible discrimination des embryons à fort potentiel implantatoire des autres, les techniques usuelles de dosage de ces métabolites présentes dans les laboratoires de biologie médicale ne sont pas utilisées à cet effet. La majorité des publications scientifiques traitant du métabolisme embryonnaire énergétique depuis les années 1980 est issue du travail de David Gardner et Henry Leese. Ainsi en 1984, Leese est le premier à s'intéresser à la consommation de glucose et la production de lactate par des ovocytes et des

embryons de souris (66). A cet effet, son équipe met au point une technique de dosage appelée microfluorométrie. Cette technique enzymatique, basée sur le couple NADH/NADPH, est réalisée dans des microgouttes de 25 à 30  $\mu\text{L}$  au sein de cupules en silicone et sous huile minérale. Le dosage du glucose fait intervenir l'hexokinase tandis que celui du lactate utilise la lactate déshydrogénase. Le signal fluorescent produit par la réaction est lu à l'aide d'un microscope à fluorescence avec excitation ultra-violet et permet une quantification des substrats recherchés dans la gamme 0 à 1 mM. Cette technique manuelle n'est cependant pas utilisable en routine au sein des laboratoires de biologie médicale de par un temps de réalisation trop important et son manque de standardisation : c'est en effet une technique manuelle ne pouvant être réalisée que dans le cadre de la recherche. Plus récemment, ce système de dosage enzymatique a été adapté à un système microfluidique par la même équipe (67). La corrélation entre les deux techniques ainsi que leur performance analytique semblaient correctes (figure 10), bien que peu d'informations sur la validation de la méthode ne soient disponibles.



**Figure 10 :** Graphique représentant les résultats obtenus pour dix standards avec les techniques enzymatiques en microgoutte et en système microfluidique selon Urbanski et al. 2008. La catégorie Nominal correspond à la valeur cible. Les échantillons A correspondent à des standards aqueux, les échantillons B à du milieu G1 (Vitrolife) et les échantillons B à du milieu G2 (Vitrolife).

Les travaux réalisés par Gardner et Leese depuis plusieurs années et utilisant l'une ou l'autre des techniques détaillées ci-dessus ont permis de mettre en évidence

une corrélation entre la consommation embryonnaire de glucose, la production de lactate et le potentiel implantatoire embryonnaire. Ces études ont également mis à jour une différence de consommation du glucose en fonction du sexe embryonnaire avec une consommation de glucose de la part des embryons de sexe féminin 28% supérieure à celle des embryons de sexe masculin au quatrième jour de développement (68).

Cependant l'ensemble des résultats publiés relèvent d'une technique de dosage peu adaptée à la biologie médicale de routine et la standardisation de la méthode de dosage est indispensable avant de pouvoir envisager son utilisation diagnostique. Les processus de qualité prenant une place de plus en plus importante dans la pratique de la biologie médicale, seule une technique de dosage répondant à des exigences de précision et de répétabilité drastiques permettra sa démocratisation. De plus, le dosage d'un métabolite quel qu'il soit dans le milieu de culture embryonnaire le même jour que le transfert embryonnaire nécessite l'obtention d'un résultat de façon très rapide. Les bandelettes de dosage rapide utilisées dans ce travail répondant à ces deux exigences, seule leur manque de discrimination pour les faibles variations de concentration en glucose et lactate observées dans les milieux de culture embryonnaire au cours de la culture in vitro ne permet pas leur utilisation en pratique.

En conclusion, de nouvelles techniques de dosage fiable et très sensibles face à de très faibles variations de concentrations doivent être mises au point afin de permettre un dosage rapide accessible en biologie médicale.

### Recherche d'acides nucléiques dans le milieu de culture embryonnaire

L'analyse des résultats obtenus après RT-qPCR à la recherche de la présence de miRNAs dans le milieu de culture de blastocystes humains ne permet pas de conclure en dehors d'affirmer leur présence. En effet, un manque de sensibilité et de reproductibilité très important de la technique utilisée pour la détection des milieux de culture semble exister. Les Ct observés étaient élevés dans l'ensemble. La spécificité des produits amplifiés n'a pas pu être confirmée par séquençage des produits d'amplification mais leur migration par électrophorèse capillaire permet de l'estimer de par des tailles de séquences amplifiées proches de ce qui était attendu. La méthode

d'extraction de l'ARN total au phénol-chloroforme couplée à une colonne d'affinité pourrait être à l'origine d'une perte de l'information. De plus, la recherche de la présence de miRNAs dans le milieu de culture embryonnaire ne s'est intéressée qu'à la recherche de deux miRNAs décrits chacun dans une publication différente.

Récemment, Capalbo et al. (69) ont comparé les profils d'expression des miRNAs entre des cellules du trophoctoderme issus de blastocystes expansés et les milieux de culture correspondant à l'aide de puces basse densité (Capalbo et al). Ils ont mis en évidence que 96% des miRNAs présents dans le milieu de culture embryonnaire étaient exprimés par les cellules du trophoctoderme. De plus la recherche de miRNAs dans des milieux de culture embryonnaire d'embryons précoces révélait des profils similaires à ceux observés dans des milieux de culture vierges de toute culture embryonnaire. Ces deux données renforcent l'idée de l'existence d'une possible sécrétion par le trophoblaste de miRNAs par l'intermédiaire des exosomes et questionnent sur leur possible implication dans le dialogue entre l'embryon humain et la muqueuse utérine maternelle. Les auteurs caractérisent également deux miRNAs (miR-20a et miR-30c) comme différentiellement exprimés entre les milieux de culture des embryons s'étant implantés ou non et suggèrent donc la possible utilisation des miRNAs comme marqueurs prédictifs du potentiel implantatoire embryonnaire. (Figure 11)

Cependant, les conclusions issues de cette publication doivent être pondérées en regard des résultats bruts des analyses effectuées. En effet, les contrôles d'amplification utilisés n'ont pas été retrouvés dans la totalité des milieux de culture suggérant un manque de sensibilité au moment de l'extraction en ARN du milieu. Egalement, les auteurs rapportent que seuls 7% des Ct étaient inférieurs à 33 pour les qPCR réalisées dans les milieux de culture. De même, les écart-types observés dans la présentation des valeurs de miR-20a et miR-30c (Figure 11) sont suffisamment amples pour ne pas permettre leur utilisation en tant que marqueur prédictif fiable de l'implantation embryonnaire.

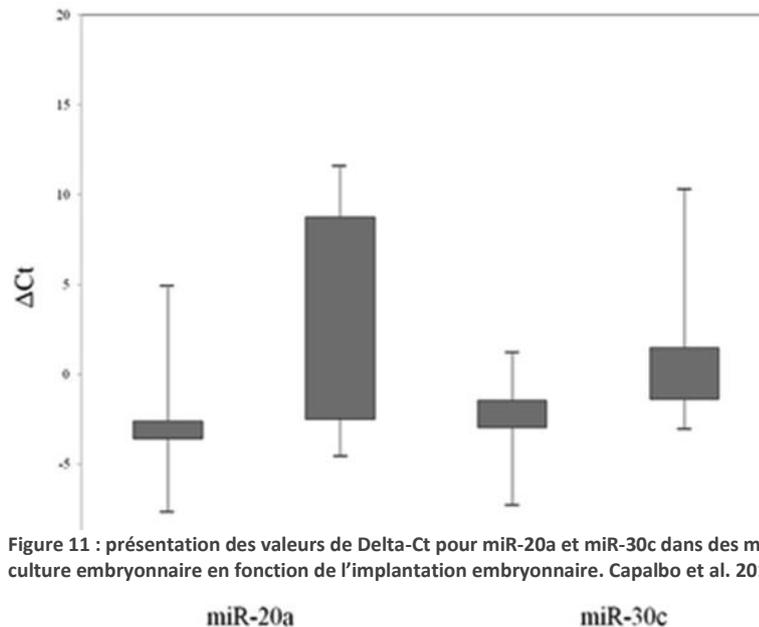


Figure 11 : présentation des valeurs de Delta-Ct pour miR-20a et miR-30c dans des milieux de culture embryonnaire en fonction de l'implantation embryonnaire. Capalbo et al. 2016.

Concernant l'ADN libre, peu de données existent à ce jour quant à sa possible utilisation en tant que marqueur prédictif d'implantation embryonnaire à l'exception d'une étude recherchant la présence d'ADN libre dans le liquide folliculaire.

En conclusion, malgré l'existence de données scientifiques encourageantes sur l'existence d'une synthèse de miRNAs par les cellules du trophoblaste des blastocystes humains et leur possible implication dans un dialogue avec la muqueuse utérine en phase lutéale, les techniques de biologie moléculaire existantes doivent encore être améliorées pour permettre une quantification précise et reproductible de ces miRNAs dans les milieux de culture embryonnaire. Ces étapes de développement sont primordiales avant de pouvoir tirer des conclusions des dosages effectués et envisager de mettre en évidence une corrélation entre la présence de miRNAs dans le milieu de culture embryonnaire et le potentiel implantatoire des embryons étudiés.

## Recherche de marqueurs protéiques dans le milieu de culture

Les avancées technologiques récentes dans le domaine de la protéomique ont permis d'envisager l'étude de la sécrétion protéique des blastocystes dans le milieu de culture embryonnaire. Ainsi, de nettes différences ont pu être observées entre la composition protéique des milieux de cultures d'embryons cultivés suite à une FIV et des milieux de culture vierges. Ces différences de composition protéique représentent le sécrétome embryonnaire et dont l'investigation pourrait être à l'origine de la mise en évidence d'un biomarqueur protéique corrélé aux chances d'implantation embryonnaire. Malgré la description de nombreux potentiels marqueurs dans la littérature, aucun d'entre eux n'a pu être validé pour une utilisation en routine. La principale difficulté dans l'utilisation de la spectrométrie de masse est liée à la composition des milieux de culture utilisés dans les laboratoires de biologie de la reproduction. En effet l'albumine est le composant protéique majoritaire des milieux de synthèse utilisés et est un frein à l'utilisation de la spectrométrie de masse. L'albumine est une protéine transporteuse d'autres protéines et peptides et sa présence peut donc dissimuler celle de protéines présentes en très faible quantité. De plus, son omniprésence sur le spectre d'acquisition en spectrométrie de masse ne permet pas de rechercher les protéines faiblement exprimées. Un moyen de remédier à cet inconvénient serait de cibler directement la recherche du spectromètre de masse sur une protéine en particulier.

De la même façon, de nouvelles techniques immuno-enzymatiques de dosage ont été développées et permettent le dosage de molécules de concentration de l'ordre du femtogramme par millilitre. De plus, des techniques de dosage multiplexe, comme le système Luminex<sup>®</sup>, permettent le dosage simultané de plusieurs molécules et donc de procéder avec de faibles volumes d'échantillon. Cependant, l'utilisation de ces technologies nécessite la connaissance des molécules à rechercher. Elles ont en revanche l'avantage d'être d'utilisation facile et rapide, malgré un coût assez élevé.

Nous avons ici procédé à la recherche ciblée des protéines suivantes : BMP-2, BMP-4, IL6, SCF, Cripto-1 et GDF-15. Le choix de ces protéines est issu de données de transcriptomique de cellules uniques du trophoblaste de blastocystes humains obtenues par notre équipe de recherche. Les transcrits présents de manière significativement plus importante dans les cellules du trophoblaste que dans les

cellules des autres lignées laissaient suggérer la présence des protéines correspondantes dans le milieu de culture embryonnaire. La technologie Luminex® avait été sélectionnée pour sa facilité de réalisation, l'absence à priori de mise-au-point nécessaire et la disponibilité des dosages pour les protéines sélectionnées avec une bonne sensibilité. De plus, Dominguez et al. (56) avaient précédemment utilisé cette technologie pour le dosage entre autres de l'IL-6 dans le milieu de culture embryonnaire et avaient conclu à une corrélation entre la présence de l'IL-6 dans le milieu de culture et les chances d'implantation embryonnaire. Cependant, il n'a pas été possible de quantifier la présence des protéines sélectionnées dans le milieu de culture lors de l'utilisation du kit. Comme décrit dans les résultats, la gamme d'étalonnage pouvait être validée pour chacune des molécules. Pour les 40 milieux de culture analysés, les concentrations pour chaque protéine étaient en dessous du seuil de quantification. Un signal de fluorescence légèrement supérieur à celui du blanc était parfois obtenu suggérant la possible présence de la protéine recherchée mais en quantité infime. Les recommandations du fournisseur avaient été suivies, notamment au sujet de la dilution au demi des milieux de culture embryonnaire et du temps d'incubation entre les anticorps et les milieux de culture embryonnaire de 90 minutes.

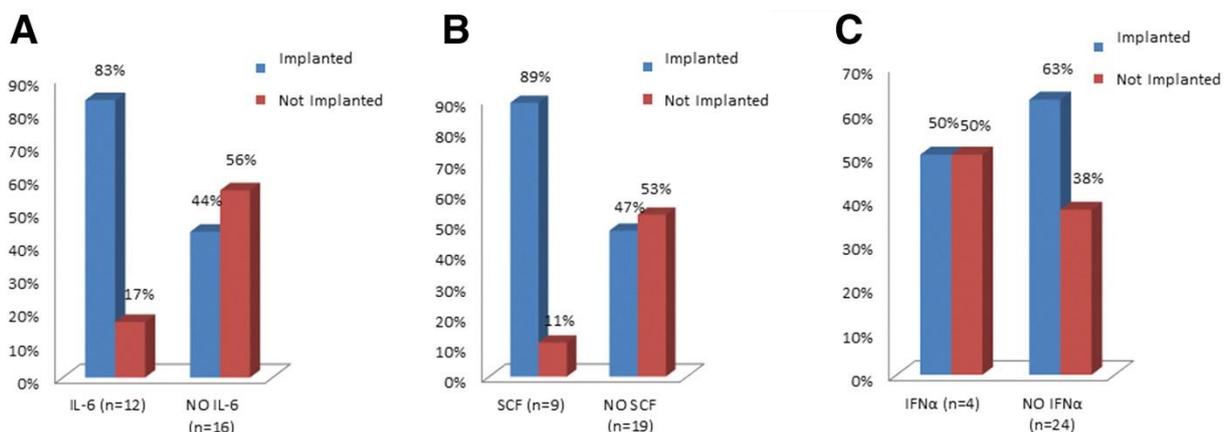


Figure 12 : Distribution de la présence ou absence d'IL-6, SCF ou INFα dans des milieux de culture embryonnaire en fonction de l'implantation embryonnaire. Les résultats ont été obtenus par dosage multiplexe sur automate Luminex®. Dominguez et al. 2015.

embryonnaire de blastocystes transférés et dont les issues de cycle se répartissaient de la façon suivante : 12 implantations embryonnaires et 16 échecs. Seuls 3 protéines avaient pu être détectables parmi le panel de protéines dosées : IL-6, SCF et INF-α. Les protéines avaient été sélectionnées à partir de données de la littérature. Ces trois protéines avaient pu être détectées mais non quantifiées dans les milieux de culture.

Aucune indication sur le seuil de signal de fluorescence permettant de discriminer la détection spécifique du bruit, d'autant plus que les milieux de culture avaient incubé toute une nuit en présence des anticorps. Ce temps d'incubation est bien supérieur aux 90 minutes recommandées par le fournisseur du kit et peut être à l'origine d'un signal non spécifique. Ainsi les résultats obtenus sont présentés sur la figure 12. Les résultats y sont représentés en pourcentage de blastocystes implantés ou non en fonction de la présence ou l'absence de chaque protéine. A priori aucune des protéines sélectionnées ne permet de discriminer de façon précise le potentiel implantatoire embryonnaire de par sa présence ou absence dans le milieu de culture embryonnaire même si les différences de distribution étaient statistiquement significativement différentes entre les groupes. Il aurait été également intéressant de connaître la corrélation entre la présence d'IL-6 et celle de SCF. En effet, il n'est pas rapporté si l'IL-6 et le SCF avaient été retrouvés dans les milieux de culture des mêmes embryons. Malgré ces effectifs relativement faible, un algorithme décisionnel combinant la détection de l'IL-6 et des paramètres morphocinétiques a été publié (Figure 4).

Il apparaît qu'une mise au point de la technologie Luminex® soit nécessaire pour permettre la quantification des protéines dans les milieux de culture embryonnaire. Seule une quantification précise autorisera l'interprétation des résultats issus du dosage de protéines dans le milieu de culture embryonnaire et la mise en évidence d'un potentiel biomarqueur de l'implantation embryonnaire.

Une alternative à l'utilisation des méthodes de dosage immuno-enzymatiques serait la recherche ciblée de ces protéines par spectrométrie de masse. En effet, la spectrométrie de masse est une technologie très sensible et spécifique permettant de rechercher et quantifier des molécules avec un seuil de quantification très bas lorsque la recherche est ciblée.

**CONCLUSION**

---

De plus en plus de couples sont confrontés à des problèmes d'infertilité et nécessitent une prise en charge en AMP. Dans le cas de la FIV et de l'ICSI, la sélection de l'embryon ayant le meilleur potentiel implantatoire est devenu un challenge médico-économique majeur. Historiquement, le choix de l'embryon à transférer est basé sur une évaluation morphologique quotidienne et les critères de sélection embryonnaires varient en fonction du stade embryonnaire auquel a lieu le transfert. Cette évaluation morphologique souffre de variation inter et intra-observateur importante et d'un caractère prédictif du potentiel implantatoire embryonnaire limité. Dans cette optique d'amélioration de la sélection embryonnaire, il est apparu essentiel de mettre en évidence de nouveaux types de marqueurs de sélection embryonnaire répondant à des exigences de performance et de standardisation élevés (70).

Le PGS semble être une technique fiable d'amélioration de la sélection embryonnaire par la connaissance du statut chromosomique embryonnaire. Cependant, en plus d'être invasives, ces techniques ne sont pas autorisées en France.

L'étude des paramètres morphocinétiques embryonnaires permettent une réduction de la variabilité inter et intra-observateur dans l'annotation embryonnaire tout en garantissant des conditions de culture embryonnaires optimales. De plus, l'utilisation de systèmes time-lapse permet l'éviction d'un plus grand nombre d'embryons à faible potentiel implantatoire en comparaison de la morphologie classique. En revanche, aucun paramètre ou algorithme basé sur la morphocinétique embryonnaire et prédictif de l'implantation n'a à ce jour pu être défini comme utilisable par l'ensemble des laboratoires.

Une autre piste consiste en la détection de biomarqueurs prédictifs de l'implantation embryonnaire dans le milieu de culture embryonnaire. Que ce soit pour des marqueurs métaboliques, des acides nucléiques ou des protéines, les technologies disponibles souffrent d'un manque de sensibilité et de reproductibilité empêchant leur utilisation en pratique courante. Cependant, le développement et l'amélioration des techniques existantes laisse envisager une utilisation prometteuse de ce type de marqueurs.

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. European IVF-Monitoring Consortium (EIM), European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Kupka MS, D'Hooghe T, Ferraretti AP, de Mouzon J, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2011: results generated from European registers by ESHRE†. *Hum Reprod Oxf Engl.* févr 2016;31(2):233-48.
2. Rapport annuel de l'Agence de Biomédecine. 2012.
3. Stephen EH, Chandra A. Updated projections of infertility in the United States: 1995-2025. *Fertil Steril.* juill 1998;70(1):30-4.
4. Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, et al. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum Genet.* sept 2013;132(9):1001-13.
5. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod Oxf Engl.* juin 2011;26(6):1270-83.
6. 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.
7. Baxter Bendus AE, Mayer JF, Shipley SK, Catherino WH. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertil Steril.* déc 2006;86(6):1608-15.
8. JOINT SOGC-CFAS. Guidelines for the number of embryos to transfer following in vitro fertilization No. 182, September 2006. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet.* août 2008;102(2):203-16.
9. Konc J, Kanyó K, Kriston R, Somoskői B, Cseh S. Cryopreservation of embryos and oocytes in human assisted reproduction. *BioMed Res Int.* 2014;2014:307268.
10. Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol.* déc 2008;199(6):660.e1-5.
11. Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online.* sept 2008;17(3):385-91.
12. Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol.* oct 2010;28(10):1115-21.
13. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod Oxf Engl.* oct 2011;26(10):2658-71.
14. Rubio I, Galán A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J, et al. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil Steril.* nov 2014;102(5):1287-94.e5.
15. Chen AA, Tan L, Suraj V, Reijo Pera R, Shen S. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. *Fertil Steril.* 15 mars 2013;99(4):1035-43.

## Bibliographie

16. Adamson GD, Abusief ME, Palao L, Witmer J, Palao LM, Gvakharia M. Improved implantation rates of day 3 embryo transfers with the use of an automated time-lapse-enabled test to aid in embryo selection. *Fertil Steril*. févr 2016;105(2):369-75.e6.
17. VerMilyea MD, Tan L, Anthony JT, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, et al. Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: a blinded, multi-centre study. *Reprod Biomed Online*. déc 2014;29(6):729-36.
18. Swain JE. Could time-lapse embryo imaging reduce the need for biopsy and PGS? *J Assist Reprod Genet*. août 2013;30(8):1081-90.
19. Davies S, Christopikou D, Tsorva E, Karagianni A, Handyside AH, Mastrominas M, et al. Delayed cleavage divisions and a prolonged transition between 2- and 4-cell stages in embryos identified as aneuploid at the 8-cell stage by array CGH. *Hum Reprod*. 1 janv 2012;27(suppl 2):ii84-6.
20. Chavez SL, Loewke KE, Han J, Moussavi F, Colls P, Munne S, et al. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nat Commun*. 2012;3:1251.
21. Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CFL. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online*. mai 2013;26(5):477-85.
22. Wells D. Embryo aneuploidy and the role of morphological and genetic screening. *Reprod Biomed Online*. sept 2010;21(3):274-7.
23. Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, et al. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum Reprod Oxf Engl*. juin 2014;29(6):1173-81.
24. Gardner DK, Leese HJ. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *J Reprod Fertil*. janv 1990;88(1):361-8.
25. Morbeck DE, Krisher RL, Herrick JR, Baumann NA, Matern D, Moyer T. Composition of commercial media used for human embryo culture. *Fertil Steril*. sept 2014;102(3):759-66.e9.
26. Vergouw CG, Botros LL, Roos P, Lens JW, Schats R, Hompes PGA, et al. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum Reprod Oxf Engl*. juill 2008;23(7):1499-504.
27. Hardarson T, Ahlström A, Rogberg L, Botros L, Hillensjö T, Westlander G, et al. Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial. *Hum Reprod Oxf Engl*. janv 2012;27(1):89-96.
28. Cortezzi SS, Cabral EC, Trevisan MG, Ferreira CR, Setti AS, Braga DP de AF, et al. Prediction of embryo implantation potential by mass spectrometry fingerprinting of the culture medium. *Reprod Camb Engl*. 12 févr 2013;
29. Sheedy JR, Yoshida A, Gardner DK. Direct injection mass spectrometry reveals unique metabolite profiles from spent human embryo culture media due to albumin source and pregnancy outcome. *Fertil Steril*. sept 2014;102(3, Supplement):e212-3.
30. Chason RJ, Csokmay J, Segars JH, DeCherney AH, Armant DR. Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and development. *Trends Endocrinol Metab TEM*. oct 2011;22(10):412-20.

## Bibliographie

31. Gardner DK, Leese HJ. Assessment of embryo viability prior to transfer by the noninvasive measurement of glucose uptake. *J Exp Zool.* avr 1987;242(1):103-5.
32. Lane M, Gardner DK. Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. *Hum Reprod Oxf Engl.* sept 1996;11(9):1975-8.
33. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril.* déc 2001;76(6):1175-80.
34. Gardner DK, Wale PL, Collins R, Lane M. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Hum Reprod Oxf Engl.* août 2011;26(8):1981-6.
35. Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod Oxf Engl.* avr 2002;17(4):999-1005.
36. Brison DR, Houghton FD, Falconer D, Roberts SA, Hawkhead J, Humpherson PG, et al. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod Oxf Engl.* oct 2004;19(10):2319-24.
37. Baumann CG, Morris DG, Sreenan JM, Leese HJ. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Mol Reprod Dev.* oct 2007;74(10):1345-53.
38. Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG, Sturmey RG. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod.* déc 2008;14(12):667-72.
39. Katz-Jaffe MG, McReynolds S, Gardner DK, Schoolcraft WB. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Mol Hum Reprod.* mai 2009;15(5):271-7.
40. Butler SA, Luttoo J, Freire MOT, Abban TK, Borrelli PTA, Iles RK. Human chorionic gonadotropin (hCG) in the secretome of cultured embryos: hyperglycosylated hCG and hCG-free beta subunit are potential markers for infertility management and treatment. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif.* sept 2013;20(9):1038-45.
41. Mains LM, Christenson L, Yang B, Sparks AET, Mathur S, Van Voorhis BJ. Identification of apolipoprotein A1 in the human embryonic secretome. *Fertil Steril.* août 2011;96(2):422-7.e2.
42. Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, et al. Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod Oxf Engl.* janv 2005;20(1):138-46.
43. Ziebe S, Loft A, Povlsen BB, Erb K, Agerholm I, Aasted M, et al. A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization. *Fertil Steril.* mai 2013;99(6):1600-9.
44. Jones KP, Warnock SH, Urry RL, Edwin SS, Mitchell MD. Immunosuppressive activity and alpha interferon concentrations in human embryo culture media as an index of potential for successful implantation. *Fertil Steril.* mars 1992;57(3):637-40.
45. Dyrland TF, Kirkegaard K, Poulsen ET, Sanggaard KW, Hindkjær JJ, Kjems J, et al. Unconditioned commercial embryo culture media contain a large variety of non-declared proteins: a comprehensive proteomics analysis. *Hum Reprod.* 11 janv 2014;29(11):2421-30.

## Bibliographie

46. Domínguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C. Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocysts. *Hum Reprod Oxf Engl.* sept 2008;23(9):1993-2000.
47. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 23 janv 2004;116(2):281-97.
48. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet.* nov 2003;35(3):215-7.
49. Medeiros LA, Dennis LM, Gill ME, Houbaviy H, Markoulaki S, Fu D, et al. Mir-290-295 deficiency in mice results in partially penetrant embryonic lethality and germ cell defects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23 août 2011;108(34):14163-8.
50. Foshay KM, Gallicano GI. miR-17 family miRNAs are expressed during early mammalian development and regulate stem cell differentiation. *Dev Biol.* 15 févr 2009;326(2):431-43.
51. Rosenbluth EM, Shelton DN, Sparks AET, Devor E, Christenson L, Van Voorhis BJ. MicroRNA expression in the human blastocyst. *Fertil Steril.* 1 mars 2013;99(3):855-61.e3.
52. Rosenbluth EM, Shelton DN, Wells LM, Sparks AET, Van Voorhis BJ. Human embryos secrete microRNAs into culture media—a potential biomarker for implantation. *Fertil Steril.* mai 2014;101(5):1493-500.
53. Kropp J, Khatib H. Characterization of microRNA in bovine in vitro culture media associated with embryo quality and development. *J Dairy Sci.* sept 2015;98(9):6552-63.
54. Altmäe S, Martinez-Conejero JA, Esteban FJ, Ruiz-Alonso M, Stavreus-Evers A, Horcajadas JA, et al. MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif.* mars 2013;20(3):308-17.
55. Scalici E, Traver S, Molinari N, Mullet T, Monforte M, Vintejou E, et al. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. *Hum Reprod Oxf Engl.* déc 2014;29(12):2661-9.
56. Dominguez F, Meseguer M, Aparicio-Ruiz B, Piqueras P, Quiñonero A, Simón C. New strategy for diagnosing embryo implantation potential by combining proteomics and time-lapse technologies. *Fertil Steril.* oct 2015;104(4):908-14.
57. Kirkegaard K, Ahlström A, Ingerslev HJ, Hardarson T. Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertil Steril.* févr 2015;103(2):323-32.
58. Kropp J, Salih SM, Khatib H. Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. *Livest Genomics.* 2014;5:91.
59. Moalic V, Mercier B, Ferec C. Technologie Luminex™ : principe, applications, et perspectives. *Immuno-Anal Biol Spéc.* août 2004;19(4):181-7.
60. Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum Reprod Update.* 6 janv 2015;
61. Goodman LR, Goldberg J, Falcone T, Austin C, Desai N. Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertil Steril.* févr 2016;105(2):275-85.e10.

## Bibliographie

62. Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, Aguilar J, Chamayou S, Esbert M, et al. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum Reprod Oxf Engl.* déc 2014;29(12):2650-60.
63. Basile N, Morbeck D, García-Velasco J, Bronet F, Meseguer M. Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes. *Hum Reprod Oxf Engl.* mars 2013;28(3):634-41.
64. Bodri D, Sugimoto T, Serna JY, Kondo M, Kato R, Kawachiya S, et al. Influence of different oocyte insemination techniques on early and late morphokinetic parameters: retrospective analysis of 500 time-lapse monitored blastocysts. *Fertil Steril.* nov 2015;104(5):1175-81.e1-2.
65. Liu Y, Chapple V, Feenan K, Roberts P, Matson P. Time-lapse videography of human embryos: Using pronuclear fading rather than insemination in IVF and ICSI cycles removes inconsistencies in time to reach early cleavage milestones. *Reprod Biol.* juin 2015;15(2):122-5.
66. Leese HJ, Barton AM. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil.* sept 1984;72(1):9-13.
67. Urbanski JP, Johnson MT, Craig DD, Potter DL, Gardner DK, Thorsen T. Noninvasive Metabolic Profiling using Microfluidics for Analysis of Single Preimplantation Embryos. *Anal Chem.* 1 sept 2008;80(17):6500-7.
68. Gardner DK, Wale PL, Collins R, Lane M. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Hum Reprod.* 8 janv 2011;26(8):1981-6.
69. Capalbo A, Ubaldi FM, Cimadomo D, Noli L, Khalaf Y, Farcomeni A, et al. MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophectoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertil Steril.* janv 2016;105(1):225-35.e3.
70. Lundin K, Ahlström A. Quality control and standardization of embryo morphology scoring and viability markers. *Reprod Biomed Online.* 17 juill 2015;

NOM : REIGNIER

PRENOM : ARNAUD

**Titre de thèse : Evaluation non invasive de la qualité embryonnaire**

---

L'Assistance Médicale à la Procréation a pour but la naissance d'un enfant en bonne santé. La sélection de l'embryon à transférer au cours d'une Fécondation In Vitro repose actuellement sur l'évaluation morphologique quotidienne, critère peu sensible et prédictif de l'implantation. En l'absence d'autorisation du dépistage des anomalies chromosomiques embryonnaires en France, il est primordial de mettre en évidence de nouveaux marqueurs non invasifs de la qualité et du potentiel implantatoire embryonnaire. L'analyse de la morphocinétique embryonnaire et la recherche de biomarqueurs dans le milieu de culture par analyse métabolomique, protéomique ou génomique constituent des approches prometteuses bien qu'aucun paramètre ne soit encore utilisable en routine. Une amélioration des technologies existantes est nécessaire pour permettre l'utilisation de tels paramètres.

---

**MOTS-CLES**

AMP – Time Lapse – FIV – Embryon