

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2016

N° 065

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE
Conformément aux dispositions du décret n°2003-76 du 23 Janvier 2003 tient lieu de

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Présenté et soutenue publiquement le 12 mai 2016

Olakunlé, Bobby AFOLAYAN
né le 21/12/1983

**Facteurs prédictifs de naissance vivante après transfert
d'embryon vitrifié au stade blastocyste**

Président : Monsieur le Professeur Paul BARRIERE

Directeur de Thèse : Monsieur le Docteur Thomas FREOUR

Membres du Jury : Monsieur le Professeur Damien MASSON
Madame le Professeur Virginie FERRE

TABLES DES MATIERES

TABLES DES MATIERES.....	2
ABREVIATIONS	4
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	6
INTRODUCTION.....	7
PARTIE I : GENERALITES SUR LA FIV ET LE TRANSFERT D'EMBRYON CONGELE.....	9
I. LA FECONDATION IN VITRO	10
A. Recueil des ovocytes	10
B. La préparation des spermatozoïdes (la capacitation).....	11
C. La mise en contact des ovocytes avec les spermatozoïdes.....	13
D. Culture embryonnaire.....	13
E. Transfert embryonnaire frais.....	15
F. Embryons surnuméraires.....	16
II. LE TRANSFERT D'EMBRYON CONGELE.....	18
A. Principe de la cryoconservation.....	18
B. La congélation lente.....	18
C. La vitrification	19
D. Le transfert différé « Freeze all ».....	22
E. Préparation au transfert et à l'implantation	23
PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE.....	28
I. INTRODUCTION	28
II. MATERIELS ET METHODES	30
A. Critères d'inclusion	30
B. Critères d'exclusion	30
C. Déroulement du cycle de stimulation.....	30
D. Stratégie du transfert frais	32
E. Caractéristiques du cycle de transfert congelé.....	33
F. Recueil des données :	34
G. Critères de jugement	36
H. Analyses statistiques.....	36
III. RESULTATS	38

A.	<i>Flowchart des issues cliniques et survies immédiates après 775 cycles de décongélation.</i>	38
B.	<i>Caractéristiques des populations</i>	39
C.	<i>Caractéristiques du cycle de FIV/ICSI</i>	42
D.	<i>Stratégie de mise en fécondation de l'ensemble des ovocytes recueillis</i>	43
E.	<i>Stratégie de transfert différé avec « freeze all »</i>	44
F.	<i>Issues du cycle frais</i>	45
G.	<i>La qualité embryonnaire</i>	46
H.	<i>Caractéristiques du cycle de transfert d'embryon congelé (TEC)</i>	51
I.	<i>Etudes des cycles sans transfert pour lyse</i>	52
J.	<i>Analyse multivariée des facteurs prédictifs de naissance</i>	53
IV.	DISCUSSION	55
A.	<i>Principaux résultats</i>	55
B.	<i>Limites de l'étude</i>	55
C.	<i>Le transfert différé</i>	55
D.	<i>Le jour de vitrification</i>	57
E.	<i>La qualité morphologique du blastocyste</i>	59
V.	CONCLUSION	62
	BIBLIOGRAPHIE	63

ABRÉVIATIONS

ABM	Agence de la biomédecine
AMH	Hormone anti-mullerienne
AMP	Assistance médicale à la procréation
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CSF	Facteur de stimulation des colonies
DET	Double embryo transfer
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPI	Diagnostic génétique préimplantatoire
E2	Œstradiol
EGF	Facteur de croissance épithéliale
FIV	Fécondation In Vitro
FSH	Follicule Stimulating Hormone
GEU	Grossesse extra utérine
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
GP	Globules polaires
hCG	human Chorionic Gonadotropin
hMG	Gonadotropine ménopausique humaine
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection
IL-1	Interleukine 1
IOP	Insuffisance ovarienne primitive
LH	Luteinizing Hormone
LIF	Facteur d'inhibition de la leucémie
PN	Pronucléi
SET	Single embryo transfer
SOPK	Syndrome des ovaires polykystiques
TEV	Transfert d'embryon vitrifié
Tg	Température de transition vitreuse
TGC	Taux de grossesse clinique par cycle de décongélation
Th	Température de nucléation
Tm	Température de fusion
TNG	Taux de naissance gémellaire par accouchement
TNV	Taux de naissance vivante par cycle de décongélation
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : De la fécondation à l'implantation

Figure 2 : Exemple d'un protocole antagoniste en vue d'une FIV/ICSI

Figure 3 : Capacitation des spermatozoïdes sur un gradient et « swim-up »

Figure 4 : Mise en contact des gamètes

Figure 5 : Développement embryonnaire pré implantatoire

Figure 6 : Classification de *Gardner et Schoolcraft*

Figure 7 : Diagramme de phases en fonction de la concentration en cryoprotecteurs

Figure 8 : Protocole de vitrification des blastocystes

Figure 9 : Comparaison entre système de vitrification fermé et ouvert

Figure 10 : Implantation endométriale

Figure 11 : Répartition des 775 cycles de décongélation de blastocystes vitrifiés

Figure 12 : Degrés d'expansion du blastocyste après réchauffement

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Issues en fonction des caractéristiques de la population féminine

Tableau II: Issues en fonction de l'âge féminin

Tableau III : Issues en fonction du taux d'AMH

Tableau IV: Issues en fonction du statut ovulatoire

Tableau V: Issues en fonction des indications

Tableau VI : Issues en fonction de l'intoxication tabagique

Tableau VII Issues en fonction du cycle de stimulation ovarienne

Tableau VIII : Issues en fonction de la stratégie de mise en fécondation de l'ensemble des ovocytes.

Tableau IX : Issues en fonction de la stratégie de transfert différé (« freeze all »)

Tableau X Analyses des facteurs confondants entre « freeze all », jour de congélation et qualité du blastocyste.

Tableau XI: Issues en fonction de l'issue du transfert frais

Tableau XII: Issues en fonction du nombre de blastocystes vitrifiés à J5 disponible dans la cohorte

Tableau XIII : Issues en fonction du jour de vitrification et de réchauffement

Tableau XIV : Comparaison des issues en fonction de l'expansion du blastocyste après réchauffement

Tableau XV : Taux de cycle annulé pour lyse complète en fonction de l'expansion du blastocyste

Tableau XVI: Comparaison du jour de congélation en fonction de l'expansion du blastocyste

Tableau XVII: Comparaison des issues en fonction du grade du bouton embryonnaire

Tableau XVIII: Comparaison des issues en fonction du grade du trophoctoderme

Tableau XIX: Comparaison des issues en fonction du caractère expansé ou rétracté à la décongélation

Tableau XX : Taux de naissances en fonction de la qualité du bouton embryonnaire et du trophoctoderme

Tableau XXI: Naissances en fonction de la qualité du bouton et du trophoctoderme

Tableau XXII: Naissance en fonction de la qualité des blastocystes : bouton embryonnaire, trophoctoderme et date de vitrification à J5 ou J6

Tableau XXIII : Comparaison des issues en fonction des données du cycle de TEC

Tableau XXIV: Comparaison de la possibilité de transfert congelé en fonction des caractéristiques de la population féminine

Tableau XXV : Comparaison de la possibilité de transfert congelé en fonction des antécédents de tabagisme maternel

Tableau XXVI : Comparaison de la possibilité de transfert congelé en fonction de l'âge de la patiente à la congélation

Tableau XXVII : Comparaison de la possibilité de transfert en fonction de la technique AMP

Tableau XXVIII: Comparaison de la possibilité de transfert en fonction de la date de congélation J5/J6

Tableau XXIX : Identification des facteurs prédictifs de naissance après TEV par régression logistique simple

Tableau XXX : Identification des facteurs prédictifs de naissance après TEV par régression logistique automatisée (« stepwise »)

Tableau XXXI : Indications du transfert différé (« freeze all »)

INTRODUCTION

L'assistance médicale à la procréation (AMP) est un ensemble de techniques qui permettent de pallier aux difficultés à concevoir. Elle remédie aux difficultés de rencontre entre le spermatozoïde et l'ovocyte sans nécessairement traiter la cause. En France, en 2013, on dénombrait 23651 enfants nés grâce à l'AMP soit environ 2,9% des naissances. Selon l'agence de la biomédecine (ABM), la part des naissances issues de ces techniques ne cessera d'augmenter et environ 1 couple sur 10 aura recours à l'AMP.

Parmi les techniques d'AMP, la fécondation in vitro (FIV) et la micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) font partie des solutions permettant de répondre aux problèmes d'infertilité de certains couples. Ces deux techniques permettent d'obtenir une fécondation au laboratoire et d'aboutir à la formation d'embryons en culture.

La culture embryonnaire jusqu'à un stade blastocyste, stade prolongé correspondant au 5ème jour de développement par rapport au 3^{ème} jour constitue également une avancée. Ceci permet une sélection des embryons au potentiel implantatoire plus élevé.

D'autres techniques permettent la cryoconservation des embryons surnuméraires viables pour leur utilisation lors d'un prochain cycle. Ce sont la congélation lente et la vitrification. Ces techniques augmentent les chances cumulatives de grossesse par cycle de FIV/ICSI. Lorsque le transfert en frais aura échoué ou aura été différé ou en cas de succès de celle-ci, la congélation donne la possibilité de mettre en route un nouveau transfert sans repasser par l'étape stimulation-ponction. En 2013, 16 % des naissances liées à l'AMP sont issues d'une cryoconservation selon l'ABM.

L'autorisation de la vitrification en France est récente. Les réserves portaient sur un éventuel risque de toxicité dû aux concentrations très élevées en cryoprotecteur et un éventuel risque sanitaire lié à la possibilité de transmission virale au contact de l'azote liquide utilisé. C'est à partir de 2010, après révision de la loi de bioéthique et un avis favorable de l'ABM que les centres d'AMP ont eu accès à cette technique au bénéfice des couples. L'innocuité et la supériorité de la vitrification par rapport à la congélation lente ont par ailleurs été démontrées dans la littérature à plusieurs reprises (Wennerholm et al. 2009) (Vanderzwalmen et al. 2006) (AbdelHafez et al. 2010). Le taux de survie des blastocystes après réchauffement est significativement meilleur pour la vitrification (Kuwayama et al. 2005) (AbdelHafez et al. 2010). Le transfert après réchauffement d'un embryon congelé

donne des taux de grossesse comparables aux transferts frais. Cette technique a progressivement supplanté la congélation lente et peut être proposée comme une alternative au transfert frais notamment après échec d'une première tentative de transfert en cycle frais (B. S. Shapiro et al. 2014b).

Cependant, ces résultats demeurent très hétérogènes suivant les centres et les facteurs qui influencent les issues après réchauffement ne sont pas consensuels. Pour notre part, nous avons opté pour la vitrification fin 2011. Les embryons sont vitrifiés majoritairement au stade blastocyste.

Nous avons voulu par ce travail déterminer les facteurs cliniques et/ou biologiques prédictifs de naissances vivantes après transfert d'un blastocyste vitrifié puis réchauffé. Les résultats de cette étude seront exposés après un bref rappel sur les généralités de la FIV et du transfert d'embryon vitrifié.

PARTIE I : Généralités sur la FIV et le Transfert d'Embryon Congelé

L'organisation mondiale de la santé (OMS) définit l'infertilité comme l'incapacité pour un couple à concevoir ou de mener une grossesse à terme au bout de douze mois ou plus de rapports réguliers et en l'absence de contraception (OMS, 2010).

Depuis la naissance en 1978 du premier enfant conçu grâce à la FIV, le traitement de l'infertilité a considérablement évolué (Edwards, Steptoe, et Purdy 1980).

La fécondation est la rencontre d'un spermatozoïde avec un ovocyte aboutissant à une cellule unique. Cette rencontre a lieu au tiers supéro-externe de la trompe (Figure 1). Pour cela le spermatozoïde a dû migrer dans les voies génitales féminines et acquies une étape de maturation membranaire : la capacitation, indispensable à la fécondation. De la fécondation de l'ovocyte découle la formation d'un embryon qui s'implantera six jours plus tard dans la cavité utérine. Dans le cadre de la FIV cette rencontre a lieu au laboratoire.

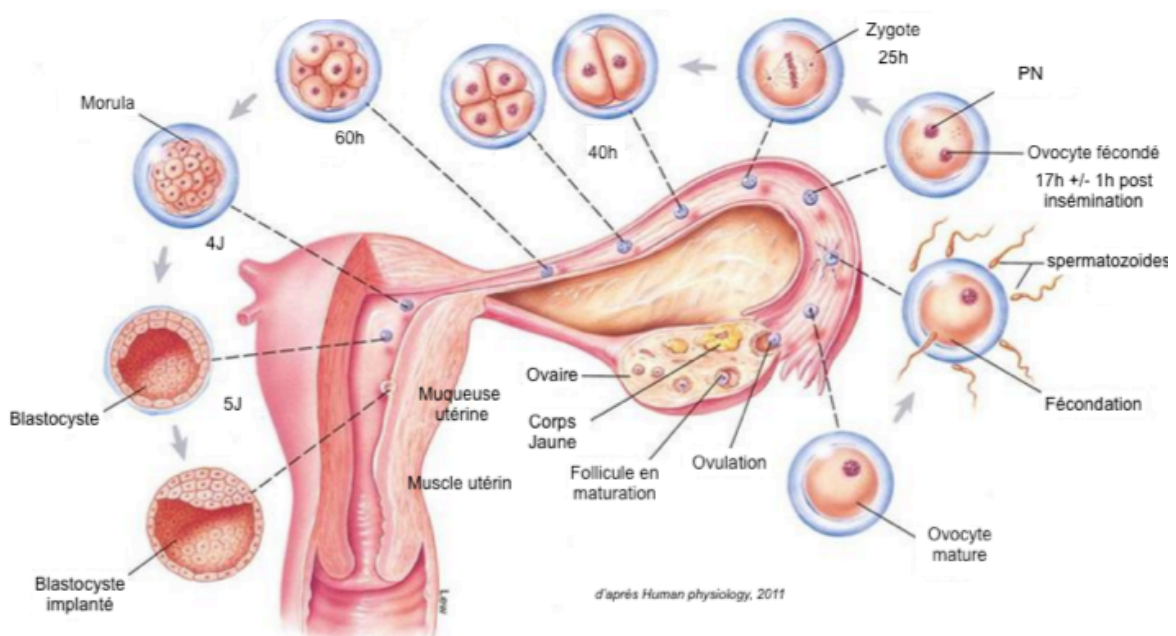


Figure 1 : De la fécondation à l'implantation

PN : Pronucléi

I. La fécondation in vitro

La FIV se déroule en plusieurs étapes.

A. Recueil des ovocytes

- **La stimulation ovocytaire contrôlée**

Afin de multiplier les chances de succès pour chaque cycle de FIV, il est important de disposer d'un nombre important d'ovocytes. La stimulation ovocytaire en prenant le contrôle sur le système hypothalamo-hypophysaire permet le développement de plusieurs follicules en même temps. Elle se fait par l'injection quotidienne sous cutanée d'hormones hypophysaires : FSH (Follicule Stimulating Hormone) plus ou moins LH (Luteinizing Hormone). Le blocage de l'ovulation spontanée peut se faire par un antagoniste de la GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) ou un agoniste de la GnRH après désensibilisation de l'hypophyse en fonction du protocole (figure 2). Cette stimulation doit être contrôlée afin d'éviter tout risque d'emballlement du système hypothalamo-hypophysaire conduisant au syndrome d'hyperstimulation ovarienne (SHO). Ainsi, le suivi de la croissance folliculaire est réalisé régulièrement par des dosages hormonaux : Œstradiol (E2), Hormone luténisante (LH), Progestérone (Pg) et par échographie pelvienne. Ce monitoring permet également d'estimer la date optimale pour le déclenchement de l'ovulation.

Dans un cycle naturel, l'ovocyte reprend sa division méiotique et expulse un premier globule polaire (GP) lors d'un pic de LH. Cette maturation est indispensable à la fécondation. En cycle stimulé, le déclenchement est réalisé par l'injection d'hCG (human Chorionic Gonadotropin). L'hCG a une homologie de sous unité bêta avec la LH mimant le pic de LH avant l'ovulation. Ceci conduit à une élévation en progestérone et autres facteurs utiles à la maturation ovocytaire. L'horaire du déclenchement va déterminer l'horaire de la ponction.

- **La ponction ovocytaire**

La ponction ovocytaire se déroule 36 heures après le déclenchement donnant le temps à une maturation ovocytaire satisfaisante. Au delà, le danger vient du risque d'ovulation spontanée aboutissant à une ponction blanche. La ponction est réalisée au bloc opératoire sans ou avec anesthésie. Les follicules sont récoltés à l'aide d'une aiguille sous échographie transvaginale. À la réception du liquide de ponction, les complexes cumulo-ovocytaires

sont recherchés sous loupe binoculaire avec une micropipette et mis dans un milieu de culture optimisé en glucose et acides aminés et placés dans un incubateur à 37°C.

Jours	J1	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S19	30
FSH (entre 150 et 225 UI)	R	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			P	T	b
Antagoniste GnRH	E						X	X	X	X	X	X			O	R	H
hCG	G														N	A	C
	L												X		T	S	G
E2 LH Pg	E					X				X			X		I	F	
Echographie	S						X			X			X		O	E	
															N	R	
																T	

Figure 2 : Exemple d'un protocole antagoniste en vue d'une FIV/ICSI

B. La préparation des spermatozoïdes (la capacitation)

Les spermatozoïdes sont recueillis par masturbation le même jour que la ponction. Ils ne sont pas féconds. L'aptitude à féconder est obtenue après le bon déroulement de la capacitation.

In vivo, la capacitation est acquise naturellement lors de la migration dans les voies génitales de la femme. Elle correspond à une maturation fonctionnelle du spermatozoïde au contact de la glaire cervicale. Celle-ci permet de sélectionner les spermatozoïdes en fonction de leur mobilité et de leur morphologie. La glaire joue un rôle de barrière empêchant les spermatozoïdes morts, les cellules germinales, les leucocytes, les macrophages, les éventuelles bactéries et le plasma séminal de pénétrer dans l'utérus. L'élimination du plasma séminal autour du spermatozoïde et les modifications phospholipidiques de la paroi intra-membranaire découvrent les récepteurs indispensables à la reconnaissance de l'ovocyte. Ceci ouvre la possibilité au spermatozoïde de se fixer à la protéine ZP3 de la zone pellucide. Par la suite, lors de la réaction acrosomique, les enzymes nécessaires à la pénétration dans l'ovocyte contenue dans l'acrosome seront libérées.

Cette sélection de spermatozoïdes au potentiel fécondant doit donc être reproduite in vitro. La préparation de sperme consiste en une centrifugation du recueil sur un gradient de densité contenant des billes de silices mimant la glaire cervicale. Cette épreuve permet de sélectionner les spermatozoïdes en fonction de leur morphologie. Les spermatozoïdes vivants normaux ayant une densité supérieure à 1,1 g/mL migrent vers le fond du tube. Au terme de la préparation, le plasma séminal, les débris, les leucocytes et les spermatozoïdes

anormaux de densité inférieure à 1,1 g/mL sont éliminés. Une épreuve de migration ascendante (swim up) permet, en FIV classique de recueillir les spermatozoïdes les plus mobiles et les plus aptes à féconder. Le spermatozoïde acquiert alors une mobilité hyperactive du flagelle et de la tête, témoin de la maturation et également de la qualité de la préparation (figure 3).

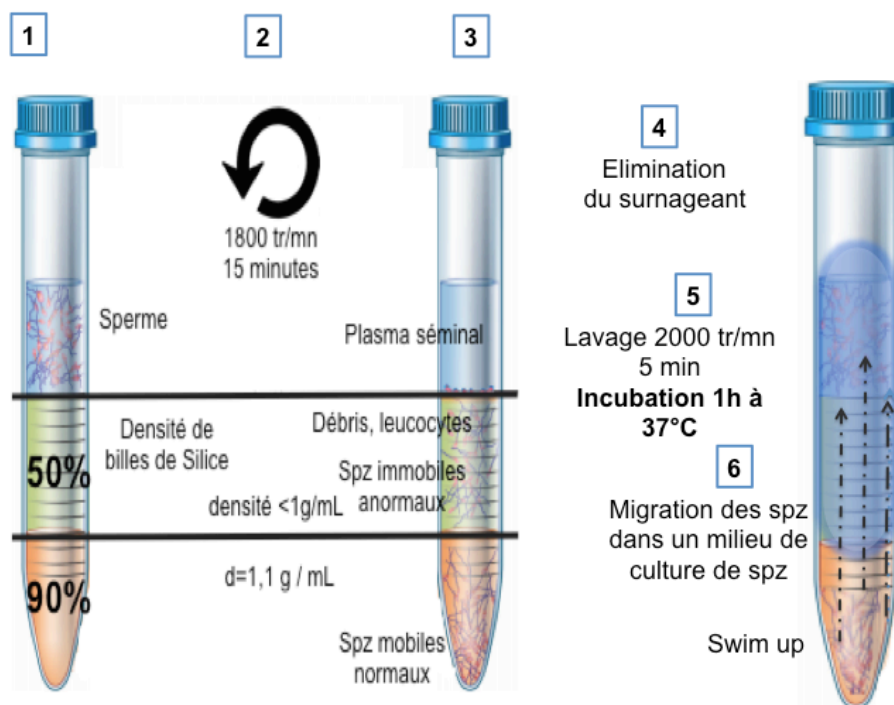


Figure 3 : Capacitation des spermatozoïdes sur un gradient et « swim-up »

(1) Un maximum de 4 ml de sperme frais est déposé sur un gradient de densité (1mL d'un milieu de silice à 50% et 1mL de 90%). (2) Le tout est centrifugé pendant 15 minutes à 1800 tours/minutes. (3) Les éléments contenus dans le sperme migrent en fonction de leur densité. Les spermatozoïdes normaux se retrouvent au fond du tube. (4) Les débris, spermatozoïdes anormaux, leucocytes et plasma séminal se retrouvent dans le surnageant et sont éliminés. (5) Après une épreuve de lavage, une épreuve de migration ascendante est réalisée en ajoutant délicatement au dessus du culot environ 500 µL de milieu de culture de spermatozoïdes. (5,6) L'ensemble est incubé pendant une heures à 37°C laissant les spermatozoïdes les plus mobiles migrer vers le haut (swim-up).

C. La mise en contact des ovocytes avec les spermatozoïdes

La mise en contact des spermatozoïdes peut être réalisée de deux façons selon la qualité des spermatozoïdes : l'insémination ou la micro-injection. Le choix de la technique dépend des paramètres du spermogramme le jour du recueil, par rapport aux critères de l'OMS 2010. La FIV classique correspond à l'insémination dans un milieu de culture d'une centaine de milliers de spermatozoïdes mobiles avec un ovocyte. La sélection du spermatozoïde fécondant se fait naturellement. La deuxième possibilité consiste en la FIV-ICSI. Elle nécessite une étape de micromanipulation des gamètes permettant l'injection directement dans l'ovocyte d'un spermatozoïde sélectionné à l'aide d'une micropipette (figure 4).

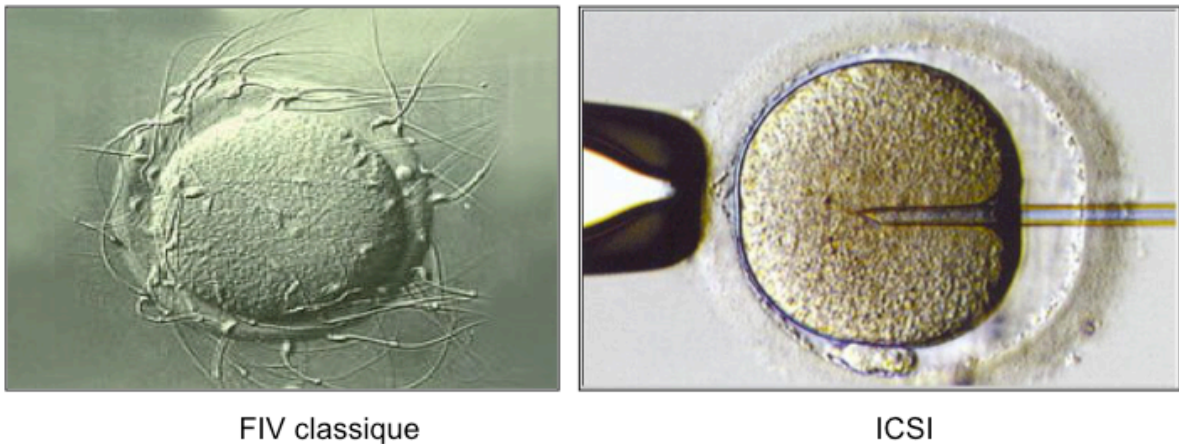


Figure 4 : Mise en contact des gamètes

D. Culture embryonnaire

- **Développement embryonnaire pré implantatoire**

La fécondation est appréciée par la présence de deux pronucléi (PN) et l'expulsion d'un deuxième globule polaire (GP) après 16 à 18 heures de culture. L'ovocyte fécondé devient zygote après fusion des pronucléi et leur disparition. Puis surviennent les étapes de

segmentation cellulaire. Un clivage précoce (2 cellules) avant la 25^{ème} heure est un facteur jugé positif pour une chance d'implantation. La segmentation se poursuit par la formation d'un nombre croissant de blastomères, la compaction au quatrième jour définissant le stade morula et finalement la formation du blastocyste au cinquième jour (figure 5).

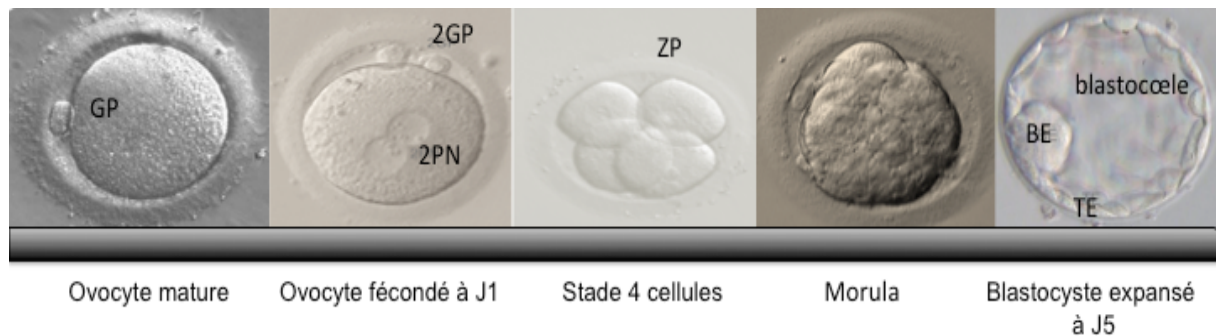


Figure 5 : Développement embryonnaire pré implantatoire

GP : Globule polaire ; PN: Pronucléi ; ZP: Zone pellucide ;

BE : Bouton embryonnaire ; TE : Trophectoderme ;

La qualité du développement embryonnaire est évaluée quotidiennement selon sa morphologie. De J2 à J3, on évalue le nombre de blastomère, leur régularité et le pourcentage de fragmentation. De J4 à J6, la classification de *Gardner* et *Schoolcraft* donne une idée précise de la qualité du blastocyste (Gardner et al. 2000). L'embryon est apprécié selon la qualité du développement du blastocœle, de la qualité du trophoctoderme (TE) et du bouton embryonnaire (BE) (Figure 6).

- **Milieu de culture embryonnaire**

Une meilleure compréhension du microenvironnement physiologique intra utérin où évolue l'embryon avant son implantation a permis le développement de milieux de culture permettant la croissance des embryons jusqu'au stade blastocyste. La composition de ces milieux en micronutriments est modifiée en fonction du développement embryonnaire surtout avant et après la compaction des blastomères à J4. Les milieux séquentiels sont composés d'un premier milieu contenant une faible quantité de glucose et peu d'acides aminés puis d'un deuxième milieu utilisé à partir du troisième jour, au contraire riche en

glucose et en différents acides aminés (Gardner, Lane, et Schoolcraft 2002) (Lane et Gardner 2007). Les milieux globaux quant à eux possèdent tous les nutriments nécessaires au développement de la fécondation jusqu'à l'implantation de l'embryon.

- **Intérêt de la culture prolongée**

Le développement jusqu'à un stade blastocyste permet une sélection embryonnaire naturelle.

Dans sa phase initiale, le développement est sous contrôle des gènes maternels. Le contrôle embryonnaire intervient lors de la mise en activité des gènes embryonnaires coïncidant avec la transition blastuléenne. Un défaut ou une perturbation de l'activation de la transcription du génome embryonnaire devient alors un frein à son implantation. Il est également montré qu'une bonne morphologie précoce est peu prédictive du potentiel de développement au stade blastocyste (Graham et al. 2000) (Guerif et al. 2007) (de los Santos et al. 2014) et est moins discriminative des anomalies chromosomiques comparativement à la morphologie au stade blastocyste (Magli et al. 2000). Les arrêts embryonnaires entre J3 et J5 sont en grande partie dus à l'aneuploïdie des embryons (Demko et al. 2016). Le risque d'annulation de transfert pour arrêt de développement est évidemment significativement plus élevé à J5 et J6 (Glujovsky et al. 2012).

E. Transfert embryonnaire frais

Le transfert d'embryon est le dépôt dans la cavité utérine de l'embryon au moyen d'un cathéter. Au préalable, une consultation aura permis de repérer le trajet notamment au niveau du col utérin à l'aide d'un cathéter d'essai. De même, une échographie permet la mesure de la profondeur de l'utérus et de repérer les anomalies de positionnement. L'étude de l'hystérosalpingographie, des conditions du transfert antérieur, et des éventuels antécédents obstétricaux fait également partie des prérequis avant la réalisation du transfert par le praticien. Les risques de grossesse extra utérine (GEU) sont plus élevés en cas de transfert difficile.

Le transfert transcervical en lui-même se fait sous guidage échographique. Il permet de placer l'embryon à l'aide d'un cathéter dans le fond utérin et de repérer l'arrivée de l'embryon dans l'utérus (visualisation d'une bulle d'air expulsée hors du cathéter).

Pour chaque tentative de FIV ou d'ICSI, plusieurs embryons sont mis en culture et au plus deux embryons frais seront déposés dans l'utérus. Le transfert d'un embryon frais se fera

soit à un stade clivé à partir du deuxième jour de développement ou à un stade blastocyste au 5^{ème} ou 6^{ème} jour de développement. La stratégie du transfert embryonnaire repose sur une évaluation clinico-biologique des facteurs pronostiques du couple. Ainsi seront pris en considération l'âge de la patiente, le rang de la tentative, le nombre d'ovocytes fécondés au premier jour et enfin le nombre et la qualité des embryons obtenues.

Classiquement, les patientes avec un moins bon pronostic auront un transfert de un ou deux embryons à un stade clivé en dehors de toute contre indication à une grossesse gémellaire. Les patientes de bon pronostic, en particulier les patientes jeunes (moins de 36 ans) auront le transfert d'un seul embryon au stade blastocyste même s'il y avait peu d'embryon de bonne qualité à J2 (Papanikolaou et al. 2006)(Guerif et al. 2011). L'évolution des prises en charge fait désormais proposer la culture prolongée de manière systématique.

F. Embryons surnuméraires

Les embryons surnuméraires sont cryoconservés au stade blastocyste en fonction de leur qualité de développement et de leur qualité morphologique. Ils pourront être transférés lors d'une nouvelle tentative. Les critères morphologiques sont variables selon les centres et l'histoire clinique de la patiente. La sélection morphologique au stade blastocyste est globalement plus sévère que pour le transfert frais.

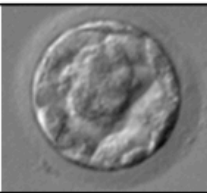
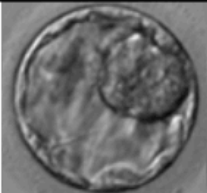
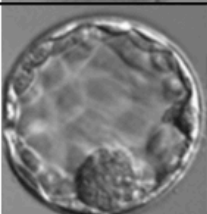
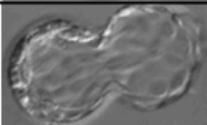
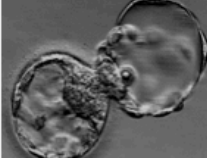
B1 Blastocystes jeunes Vol. blastocèle < 50 %		
B2 Blastocystes jeunes Vol. blastocèle > 50%		
B3 Blastocystes expansés Blastocèle >90% Zone pellucide épaisse		
B4 Blastocystes expansés Zone pellucide fine		
B5 Blastocystes en voie d'éclosion		
B6 Blastocystes éclos		
	Bouton Embryonnaire	Trophectoderme
A	Nombreuses cellules compactes	Nombreuses cellules cohésives
B	Quelques cellules lâches	Quelques cellules lâches
C	Peu de cellules	Peu de cellules

Figure 6 : Classification de *Gardner et Schoolcraft*

Système de classement en trois parties proposé par *Gardner et Schoolcraft*(*Gardner et al. 2000*). L'expansion du blastocyste est évaluée sur une échelle de 1 à 6 en. Le bouton embryonnaire (BE) est évalué sur une échelle de A à C, en fonction du nombre et du degré de cohésion des cellules et le trophoctoderme (TE) est évalué sur une échelle de A à C selon le nombre, la taille, la forme et l'agencement des cellules du trophoctoderme. Les blastocystes avec une expansion ≥ 1 avec un score BE et TE de A ou B sont considérés de bonne qualité. (*Gardner et al. 2000*)

II. Le Transfert d'Embryon Congelé

A. Principe de la cryoconservation

Un embryon est composé d'un ensemble de cellules, de molécules organiques et minérales immergeant dans une solution aqueuse. La cellule est une unité fonctionnelle où siègent de nombreuses réactions enzymatiques et biologiques dépendantes de l'eau aqueuse autour. Ces réactions façonnent son développement et son activité. La cryoconservation a pour but d'arrêter le développement biologique des cellules sans compromettre la viabilité lors du réchauffement. Le refroidissement à très basse température et le maintien sous la température de fusion (solidification) de l'eau intracellulaire aboutissent au ralentissement de cette dynamique biologique. Cependant, lors d'une congélation, il existe deux phénomènes physiques pouvant conduire à l'altération et à la lyse cellulaire.

D'une part, le choc thermique modifie la perméabilité membranaire et sa structure. La congélation augmente la pression osmotique et entraîne une déshydratation intracellulaire ayant pour conséquence une réduction de son volume. La structure de la membrane cellulaire s'en trouve ainsi fragilisée.

D'autre part, la congélation entraîne une cristallisation de l'eau intracellulaire. Or, le volume qu'occupe le cristal de glace formé est plus important que le volume initial de l'eau aqueuse. Ce phénomène est l'élément le plus préjudiciable pour la viabilité cellulaire.

B. La congélation lente

Pour pallier à ces effets, la congélation lente a longtemps été la méthode de référence. Elle est utilisée depuis plus de 30 ans (Trounson et Mohr 1983). Le principe est un refroidissement lent, contrôlé associé à une déshydratation lente de l'embryon au moyen de cryoprotecteurs. Ces cryoprotecteurs ont pour rôle de limiter la formation de cristaux intracellulaires de diminuer le volume des cristaux formés et de lutter contre les effets osmotiques. Cependant, les cryoprotecteurs utilisés sont des produits de natures toxiques pouvant être pénétrant (le Sulfoxyde de Diméthyle (DMSO), l'Éthylène Glycol, Glycérol, 1,2 propanediol) ou non (le sucrose, glucose, fructose, raffinose, polyvinylpyrrolidone (PVP), ficoll et plus généralement les macromolécules). La concentration intracellulaire en cryoprotecteurs est proportionnelle à la vitesse de refroidissement. Un équilibre doit donc nécessairement être trouvé entre la vitesse de refroidissement et la concentration en cryoprotecteurs toxiques.

La congélation lente se décompose en plusieurs étapes. L'embryon est d'abord exposé dans des bains à concentration faible et croissante en cryoprotecteurs. Ensuite, il est placé dans une paillette évitant le contact direct avec l'azote. La descente en température de -2°C par minutes est alors contrôlée au moyen d'un congélateur cryogénique jusqu'à atteindre -7°C . A cette température, la cristallisation est induite limitant le phénomène de surfusion (état d'équilibre métastable entre liquide et solide de la solution pendant la transition de phase pouvant engendrer des lésions cellulaires).

Le refroidissement se poursuit alors à -0.3°C par minutes jusqu'à la température de nucléation (T_h) -40°C . Enfin, la paillette contenant l'embryon est plongé directement dans de l'azote liquide à -196°C . Lors de la décongélation, la réhydratation lente de l'embryon se fait par le passage de l'embryon dans plusieurs milieux de cryoprotecteurs à concentration décroissante (Figure 7). Ainsi, par cette méthode peu ou pas de cristaux intracellulaires sont formés améliorant la survie après décongélation.

C. La vitrification

- **Définition**

La vitrification est un procédé de cryoconservation ultrarapide permettant le passage d'un état liquide vers un état vitreux (solide amorphe dont les atomes sont désordonnés) et limitant la formation de cristaux. Ce procédé est utilisé depuis longtemps pour la cryoconservation des embryons de mammifères et développé à partir des années 1990 pour l'AMP.

Au contraire de la congélation lente, la vitrification nécessite une concentration importante de cryoprotecteurs (Figure 7). La déshydratation et la descente en température est ultrarapide de 37°C à -196°C dans l'azote liquide mais ne doit pas compromettre la viabilité de la cellule. L'exposition aux cryoprotecteurs pénétrant (Ethylene glycol, DMSO) augmente la viscosité intracellulaire jusqu'au seuil nécessaire pour produire un état vitreux, qui sera maintenu lors du refroidissement et du réchauffement embryonnaire. Une courte exposition aux cryoprotecteurs, permet de minimiser leur toxicité potentielle (Vanderzwalmen et al. 2006). Les cryoprotecteurs non pénétrants ont un pouvoir osmotique élevé permettant une déshydratation intracellulaire modérée et donnant un aspect rétracté au blastocyste. La ré-expansion de celui-ci se fera au moment du réchauffement avant le transfert.

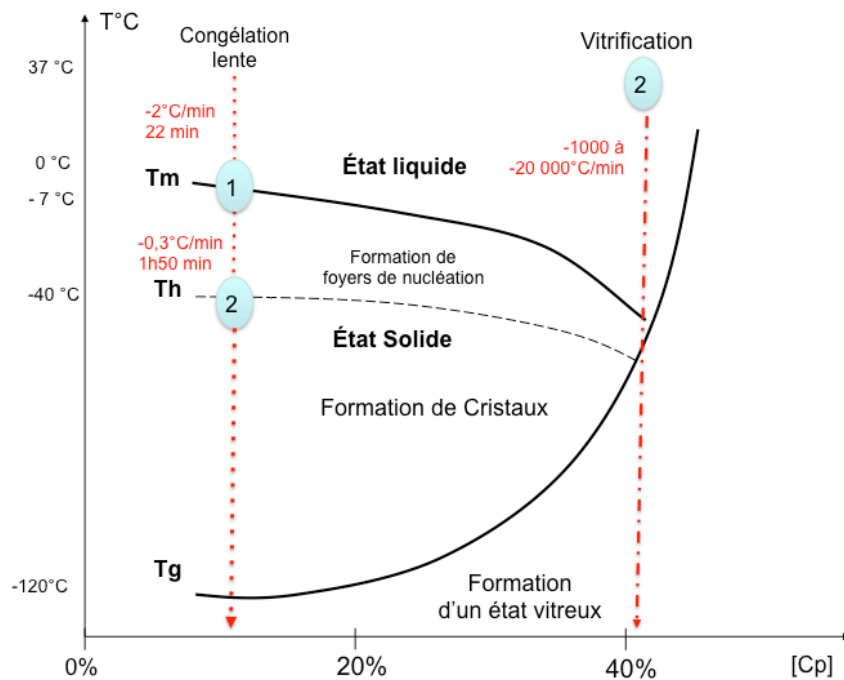


Figure 7 : Diagramme de phases en fonction de la concentration en cryoprotecteurs.

L'augmentation de la concentration en cryoprotecteurs [Cp] entraîne une diminution de la température de fusion (Tm) et de nucléation (Th) et augmente la température de transition vitreuse (Tg). (1) Induction de la cristallisation à -7°C. (2) Descente brutale en température par passage dans l'azote liquide. Entre la courbe Tm et Th se trouve une zone métastable de surfusion où l'eau est à l'équilibre entre un état liquide et un état solide et où il se forme des foyers de nucléation responsable de la cristallisation. Entre la courbe Tm et Tg se trouve une zone de probabilité de cristallisation importante à éviter lors d'une procédure de vitrification.

- **Les systèmes de vitrifications**

En système dit « ouvert », l'embryon est directement mis en contact avec l'azote liquide. La descente en température est alors de l'ordre -20000°C/min. Plus cette vitesse de refroidissement est rapide moins il y aura de formation de cristaux (figure 7). Néanmoins, il existe un risque théorique de transmission microbiologique croisée via l'azote liquide (Bielanski et al. 2000). Cette menace est résolue par le développement des systèmes « fermés ». En système « fermé », l'embryon est isolé hermétiquement de l'azote liquide. Pour être conforme avec la législation française, notre centre utilise un système de vitrification fermé. Le protocole se décompose d'une première étape où l'embryon est plongé dans des milieux successifs de cryoprotecteurs. Puis, l'embryon est fixé par capillarité à l'aide d'une loupe dans un petit orifice situé au bout du dispositif Rapid I

(figure 8). Le tout est enfin inséré dans une paillette pré-équilibrée à -196°C puis scellée hermétiquement et plongée après fermeture dans l'azote liquide. La descente en température est moins rapide qu'en système ouvert, soit environ $-1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ à $-2000^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

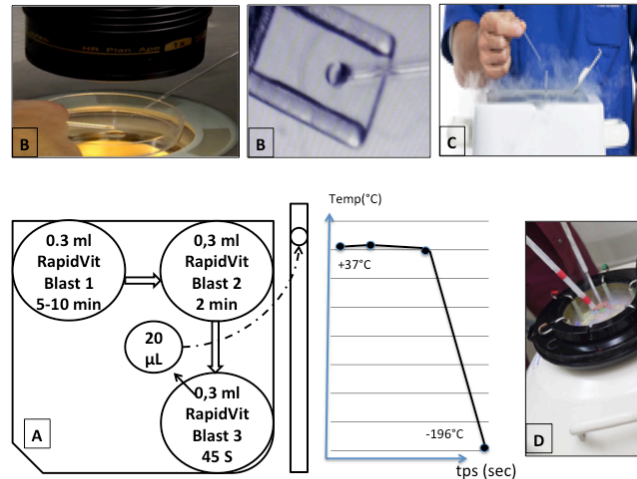


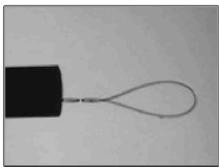
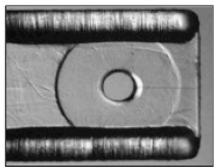
Figure 8 : Protocole de vitrification des blastocystes

(A) : Cryoprotecteurs Rapid Vit Blast. (B): Sous loupe binoculaire grossissante une microgoutte contenant l'embryon est déposée sur la gouttière du dispositif « Vitrosafe plug ». (C): Le dispositif est inséré dans la paillette haute sécurité se trouvant dans l'azote liquide et l'extrémité distale est fermée hermétiquement par soudure thermique. (D) : La paillette haute sécurité est finalement placée dans une cuve cryogénique.

Protocole Vit Blast (Vitrolife® Göteborg, Suède).

- **Comparaison entre système de vitrification fermé et ouvert**

Il n'y a pas de différences significatives sur les taux de survie et les taux de naissance entre ces deux systèmes d'après Panagiotidis et al. 2013 et Desai et al. 2013 (Panagiotidis et al. 2013) (Desai et al. 2013).

	Système ouvert (cryoloop)	Système fermé (Rapid-I)
		
Description	• Boucle en nylon • Embryon en contact direct avec l'azote liquide	• Orifice en plastique • Pas de contact direct avec l'azote liquide
Vitesse de refroidissement	> 20 000°C /min	1220°C/min
Vitesse de réchauffement	45 000°C/min	7700 °C/min

D'après (Desai et al., 2013)

Figure 9 : Comparaison entre système de vitrification fermé et ouvert

• Avantages de la vitrification par rapport à la congélation lente de blastocyste

Deux méta-analyses font état de la supériorité biologique et clinique de la vitrification par rapport à la congélation lente. La méta-analyse de Loutradi et al. 2008 portant sur 6637 blastocystes cryoconservés soit par vitrification (n=6409) ou par congélation lente (n=228) montre un taux de survie après réchauffement de 89,8 % (5763/ 6409) contre 75,4 % (172/228) respectivement, odd ratio 2,20 (IC= 1.53- 3.16) (Loutradi et al. 2008).

La méta-analyse de AbdelHafez et al. 2010 trouve un taux de grossesse clinique de 34,7% (66/190) pour la vitrification contre 27,1% (94/ 347) pour congélation lente, odd ratio de 1,82 (IC = 1.04-3.20) (AbdelHafez et al. 2010).

Par ailleurs la vitrification présente deux avantages non négligeables. Elle permet un gain de temps : 15 min contre 3 heures de congélation lente. Elle est moins onéreuse puisqu'elle ne nécessite pas l'acquisition et la maintenance d'un automate de congélation et consomme moins d'azote liquide.

D. Le transfert différé « Freeze all »

La vitrification des embryons au stade blastocyste grâce à des taux de survie proche de 100% permet de disposer de tous les embryons d'une cohorte. Elle donne une grande flexibilité dans le déroulement de l'AMP.

En cas de risque de syndrome d'hyperstimulation ovarienne (SHO), l'arrêt des gonadotrophines et l'annulation du cycle sans déclenchement ont été la règle. En effet, l'hCG a une activité lutéotrope plus élevée et plus prolongée que la LH. Elle se fixe au même récepteur que la LH avec une affinité plus importante et une demi-vie de 6 jours. Cette activité stimule la production de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) par les cellules de la granulosa lutéinisée entraînant une augmentation prolongée de la perméabilité vasculaire en partie responsable du SHO (Lamazou et al. 2011)(Boothroyd et al. 2015). Le taux d'hCG plasmatique le lendemain du déclenchement est corrélé à la survenue de SHO comme le montre Shapiro et al. 2005 (Shapiro B, et al. 2005). Cependant, lorsque le risque de SHO reste modéré, il est possible de maintenir la ponction, en diminuant ou arrêtant les doses de gonadotrophine et de déclencher l'ovulation au moyen du Décapeptyl® (agoniste de la GnRH) moins dangereuse que l'hCG. Par son effet flare up, le Décapeptyl® provoque un pic de LH permettant le déclenchement de l'ovulation. Ceci n'est possible que pour les protocoles n'utilisant pas d'agoniste de la GnRH. L'ensemble des ovocytes ou embryons viables formés seront alors congelés pour un prochain cycle car la phase lutéale dans ce contexte est complexe à substituer. La grossesse est aussi un élément aggravant par production d'hCG endogène trophoblastique (SHO dite secondaire) (Boothroyd et al. 2015).

Les patientes ayant un taux de progestérone élevé ($> 1,5$ pg/ml) le jour de l'injection de l'hCG ont un taux de grossesse clinique et d'implantation plus faible (Xu et al. 2012)(Hill et al. 2015). Cette élévation serait due à une trop bonne réponse ovarienne lors de l'hyperstimulation contrôlée ayant pour conséquence une production excessive de progestérone folliculaire et non lutéale (Xu et al. 2012). L'élévation prématurée de la progestérone aurait pour conséquence une altération de la réceptivité utérine du fait du déplacement de la fenêtre implantatoire.

Ces femmes bénéficieront également d'une congélation de l'ensemble des embryons et d'un transfert lors d'un prochain cycle avec une préparation endométriale optimale (Healy et al. 2015).

E. Préparation au transfert et à l'implantation

• Le cycle utérin

Il se décompose en trois parties. La phase menstruelle qui signe le début du cycle correspond à l'élimination de l'endomètre lors du saignement utérin (les règles) pendant 2 à

5 jours. La phase folliculaire, œstrogène dépendante permet la reconstruction de l'endomètre jusqu'à l'ovulation au 14^{ème} jour. La phase lutéale (ou sécrétoire) prépare à l'implantation embryonnaire. Lors de l'ovulation, au 14^{ème} jour, l'ovaire passe d'une production d'œstrogènes seuls à une production mixte d'œstrogènes et de progestérone. Cette sécrétion hormonale modifie la structure de l'endomètre. Celui-ci devient réceptif au blastocyste. Ceci n'est possible uniquement pour une période limitée appelée fenêtre implantatoire. Cette fenêtre débute au 7^{ème} jour après l'ovulation (pic de LH ou jour de la ponction en cycle de FIV) et se termine 4 jours après.

Par ailleurs, les œstrogènes augmentent les contractions péristaltiques de l'endomètre. Par rapport à un cycle naturel, la stimulation multi-folliculaire entraîne des taux supraphysiologiques d'œstrogènes et donc augmente le nombre de contractions par minute diminuant les chances d'implantation (Zhu, Li, et Xu 2012). Au contraire, la progestérone réduit ces contractions péristaltiques. Cette action qu'a la progestérone dépend de sa concentration et de la durée d'exposition de l'endomètre. Ceci peut aussi contribuer aux raisons pour lesquelles le transfert frais d'un embryon à J3 de développement a moins de chance d'implantation et de grossesse par rapport à un embryon à J5.

- **La préparation endométriale avant transfert d'embryon**

Elle a pour objectif de préparer l'endomètre à l'accueil du blastocyste en déterminant le moment idéal pour réaliser le transfert.

a) En cycle de TEC, elle peut être exécutée de trois manières :

1. Un cycle naturel est possible lorsque la femme a un cycle régulier et une ovulation normale. Le principal avantage est l'absence de substitution hormonale. Cependant, il est nécessaire d'avoir un suivi rapproché du cycle notamment au moment de l'ovulation avec des dosages hormonaux et des échographies pelviennes régulières afin d'optimiser au mieux le jour du transfert.
2. Un cycle substitué avec un traitement hormonal séquentiel a notre préférence pour plusieurs raisons :
 - Le protocole est simple : Il débute au premier jour du cycle via un traitement par œstrogène par voie vaginale, orale, ou patch transdermique. Ceci inhibe presque toujours l'ovulation et dans le même temps entraîne l'accroissement de l'endomètre jusqu'à une

épaisseur à 8 mm. Cette stimulation induit également la formation de récepteur à la progestérone au niveau de l'endomètre. La durée optimale de stimulation œstrogénique avant le début du traitement par progestérone n'a pas été établie mais 5 à 7 jours semblent être suffisant chez les patientes normo-répondeuses. L'association à un traitement par progestérone par voie vaginale permet de rentrer en phase sécrétoire. Le transfert d'un blastocyste congelé (J5/J6 de développement) a lieu au 7^{ème} jour de traitement par l'association progestérone et œstrogène pour être synchrone avec la fenêtre implantatoire.

- Un cycle substitué procure une grande flexibilité sur la programmation du jour du transfert par la flexibilité de l'introduction de la progestérone.
- Il diminue la surveillance biologique et le monitoring échographique.

3. Certains centres d'AMP associent au cycle substitué un traitement par un agoniste de la GnRH afin de supprimer totalement la fonction ovarienne et ainsi éviter les ovulations prématurées (Ghobara et Vanderkerchove 2008).

b) Le transfert d'un embryon frais donne moins de marge de manœuvre pour adapter la fenêtre implantatoire théorique au stade de développement de l'embryon. Il est possible d'améliorer les taux d'implantation par une supplémentation en progestérone. Le soutien de la phase lutéale par progestérone a un intérêt certain en terme de grossesse clinique et de naissance. D'autres protocoles de soutien de la phase lutéale ont également été décrits sans démontrer un réel gain (van der Linden et al. 2015).

- **L'implantation**

L'implantation est une part fondamentale de la procédure de FIV. Elle correspond à une interaction complexe entre le trophoblaste et l'endomètre maternel conduisant à la formation du placenta. L'implantation débute au 5^{ème} jour (132^{ème} h) de développement embryonnaire par une série d'événements indispensables à son bon déroulement :

- L'orientation du blastocyste se fait de telle sorte que le bouton embryonnaire fait face à l'épithélium de l'endomètre.
- L'éclosion du blastocyste (ou « hatching ») correspondant à la perte de sa zone pellucide par l'action d'une protéase sécrétée par les cellules trophoblastiques.
- L'apposition du blastocyste se fait au niveau du 2/3 supérieur et postérieur de l'utérus. Cette phase instable permet un dialogue materno-fœtale au moyen de facteurs d'implantation : Interleukine (IL1), facteurs de croissance épithéliale (EGF), facteur d'inhibition de la leucémie (LIF) et facteurs de stimulation des colonies (CSF). L'apposition est possible uniquement pendant la fenêtre implantatoire où la réceptivité de l'endomètre est maximale.
- L'adhésion correspond à une interaction physique stable du blastocyste avec l'endomètre aux moyens des ligands (IL1, LIF, EGF..).
- L'envahissement correspond à l'invasion des cellules du TE suivi par le BE entre les cellules épithéliales de l'endomètre puis au travers de la membrane basale. Le TE va devenir cyto-trophoblaste et former le placenta.

Dès le début de l'implantation, le trophoblaste sécrète une quantité croissante d'hCG pouvant être détectée dans le plasma dès le huitième jour après le transfert. Cette hormone est à l'origine du maintien du corps jaune produisant la progestérone indispensable au maintien de la muqueuse utérine. Au douzième jour, l'embryon a entièrement fusionné avec l'endomètre.

Un dosage plasmatique ou sérique de β hCG est réalisé au onzième et treizième jour post transfert. Si ce dosage est positif un suivi est nécessaire toutes les 48 h et une échographie obstétricale est réalisée à cinq semaines. La présence d'un sac gestationnel témoigne d'une implantation embryonnaire et la présence d'une activité cardiaque signe une grossesse évolutive. En l'absence d'implantation, le corps jaune régresse et les taux d'oestrogènes et de progestérone diminuent provoquant les règles.

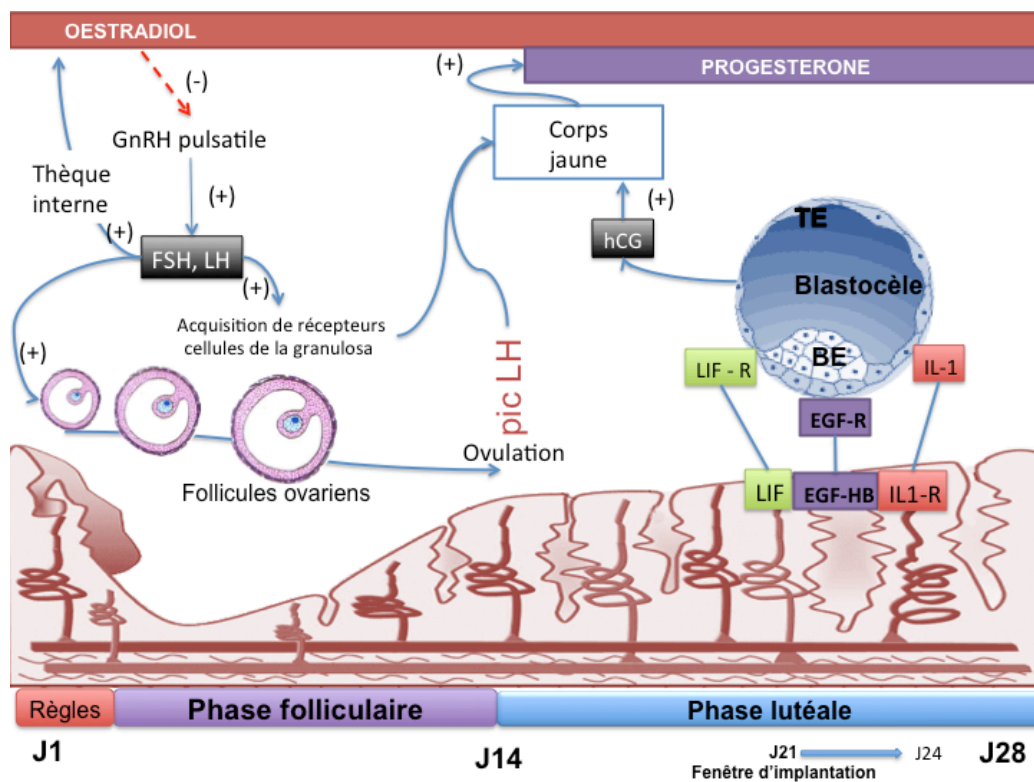


Figure 10 : Implantation endométriale

IL-1 : interleukine 1 ; **EGF** : Facteurs de croissance épithéliale, **LIF** : facteur d'inhibition de la leucémie ; **hCG** : human Chorionic Gonadotropin ;

PARTIE II : Etude Expérimentale

I. Introduction

Les deux principales complications de l'AMP sont les risques de grossesse multiple et de syndrome d'hyperstimulation ovarienne (SHO).

Les risques liés à une grossesse multiple touchent autant la mère que l'enfant. Pour la mère, les risques sont non négligeables : le développement d'une toxémie gravidique, d'un diabète gestationnel ou d'une hémorragie lors de l'accouchement. Pour l'enfant les conséquences sont principalement la fausse couche, la prématurité avec une morbi-mortalité périnatale, l'hypotrophie et les malformations. Certes le transfert simultané de plusieurs embryons augmente les chances de grossesse, mais il augmente aussi considérablement la probabilité de grossesse multiple. Il est donc rationnel de réduire le nombre d'embryons à transférer par tentative.

Le SHO est une complication fréquente liée à l'AMP mettant en jeu le pronostic vital. La survenue d'une grossesse au décours d'une SHO aggrave ce syndrome par la sécrétion d'hCG trophoblastique. Les risques sont l'accident thromboembolique, la rupture hémorragique de l'ovaire, la détresse respiratoire, le collapsus ou l'aggravation d'une ascite. Il est tout aussi logique de ne pas transférer d'embryon en cas de SHO afin d'éviter les SHO secondaires (Boothroyd et al. 2015).

Le développement de la cryoconservation et plus spécifiquement de la vitrification contribue à l'amélioration des pratiques par une politique de transfert embryonnaire plus restrictive. On accorde à la vitrification de meilleurs taux de survie après décongélation et un meilleur taux de grossesse après transfert, par rapport à la congélation lente (Li et al. 2014). Le taux cumulé de naissances par cycle de FIV en prenant en compte les transferts des embryons congelés devient un indicateur important (Luke et al. 2012)(McLernon et al. 2010).

Les résultats de la vitrification confortent la décision du clinicien. Ainsi pour éviter une grossesse multiple il soutiendra le transfert d'un seul embryon et en cas de suspicion de SHO il préférera différer le transfert pour un prochain cycle. La publication de plusieurs études témoigne de cette évolution des comportements (Gardner et al. 2004) (Karlström et Bergh 2007) (Ishihara et al. 2015) (Giorgetti et al. 2006). La vitrification des embryons est devenue un outil incontournable dans le traitement de l'infertilité.

Les connaissances sur le transfert d'embryon ont évoluées depuis quelques années. Le transfert d'un blastocyste par rapport à un embryon au stade clivé donne de meilleurs taux de naissance selon Papanikolaou et col (Papanikolaou et al. 2008). La méta analyse de Glujovsky et col. 2012 qui synthétise les données de 23 études randomisées montre que ce bénéfice de la culture prolongée était incontestable surtout lorsqu'on obtenait plusieurs embryons de bonne qualité à J2 (Glujovsky et al. 2012). D'autres facteurs prédictifs d'accouchement après transfert frais ont été décrits. Dans une étude rétrospective, Dessole et col. 2011 montrent que le transfert frais d'un blastocyste à J5 était de meilleur pronostic qu'avec un blastocyste obtenu à J6. Ils montrent également qu'une obésité féminine définie par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30, ou encore une intoxication tabagique étaient défavorables à une naissance à terme d'un enfant en bonne santé (Dessolle et al. 2011).

La sélection des blastocystes basés sur leurs qualités morphologiques est également à prendre en considération (Van den Abbeel et al. 2013).

Mais peu d'études se sont penchées sur les facteurs pronostiques de naissance après transfert d'un blastocyste vitrifié réchauffé bien que cette configuration soit de plus en plus pratiquée dans notre centre. L'intérêt réside dans la possibilité de pouvoir optimiser nos résultats et proposer aux couples ayant un moins bon pronostic une alternative améliorant ainsi leur chance d'avoir un enfant.

Le but de notre étude était de déterminer les facteurs cliniques et biologiques permettant de prévoir une naissance vivante après transfert d'un blastocyste vitrifié.

II. Matériels et Méthodes

Nous avons mené une étude rétrospective comprise entre le 1er janvier 2013 et le 31 décembre 2014 au centre d'AMP du CHU de Nantes.

A. Critères d'inclusion

L'analyse a porté sur les cycles de décongélation de blastocystes vitrifiés à J5 ou J6 de développement. Les couples inclus dans l'étude ont bénéficié d'une prise en charge intraconjugale ou avec tiers donneur. Leurs consentements à la vitrification des embryons et leur utilisation ont été obtenus au préalable.

B. Critères d'exclusion

Nous avons décidé d'exclure de notre étude, les cycles aboutissant au transfert d'un blastocyste vitrifié au 4^{ème} jour du développement (stade morula ou blastocyste) et les cycles comportant le transfert d'embryon ayant bénéficié d'une biopsie dans le cadre d'un diagnostic génétique pré-implantatoire (DPI). Les cycles de transfert initiés et annulés pour une raison autre que la lyse embryonnaire ont été exclus de l'étude. Les causes étaient surtout une anomalie de l'endomètre à l'échographie, mais aussi des erreurs de traitements ou des difficultés d'organisation.

C. Déroulement du cycle de stimulation

Un bilan hormonal au troisième jour du cycle comprenant le dosage sérique d'AMH, de FSH, d'œstradiol et un compte des follicules antraux (CFA) ont été réalisés avant toute prise en charge en AMP. Il permettait d'évaluer la réponse ovarienne sous traitement et les chances de grossesse.

Les patientes ont toutes bénéficié d'un protocole de stimulation ovarienne contrôlé. Les stimulations ont été réalisées par l'injection quotidienne sous cutanée d'hormone folliculo-stimulante (FSH) soit recombinante (rFSH ; GonalF[®], Merk Serono, France; Puregon[®], MSD, France) soit urinaire (uFSH, Fostimon[®], Genevrier, France) et/ou par l'injection de gonadotrophine ménopausique humaine (hMH, Menopur[®], Ferring, France). La dose initiale de gonadotrophines a été personnalisée individuellement en tenant compte de l'âge de la patiente, de son poids, son IMC, de sa réponse aux précédentes stimulations, des

résultats du bilan hormonal, surtout de l'hormone anti mullerienne et du compte des follicules antraux.

Les protocoles utilisant un antagoniste de la GnRH (Orgalutran® MSD, France ; Cétrotide® Merk Serono, France) ont été choisis en priorité par rapport aux protocoles agonistes longs ou courts.

Un traitement par acide folique (Spécialfoline® Sanofi-Aventis®, France) était prescrit systématiquement en pré-conceptionnel et en péri-conceptionnel afin de diminuer les risques d'anomalies de fermeture du tube neural.

Dans le cas du protocole antagoniste, le traitement par FSH était débuté au deuxième jour du cycle. Le blocage de l'ovulation spontanée était réalisé par un antagoniste de la GnRH au 6^{ème} jour de stimulation ou lorsqu'un des follicules avait atteint 14 mm de diamètre (Figure 2). Une préparation à la stimulation ovarienne était souvent réalisée lors de la fin de la phase lutéale du cycle précédent afin de limiter le risque de sélection précoce d'un ou d'un faible nombre de follicules. Ceci était proposé par la prise quotidienne d'oestradiol (Provames® Sanofi-Aventis, France).

Dans le cas des protocoles agonistes, il était associé au traitement par FSH, un agoniste de la GnRH (Décapeptyl®, Ipsen Pharma, France).

Le suivi était réalisé par un monitoring échographique (Sonosite Titan®) associé à un bilan hormonal au 5^{ème} ou 6^{ème} jour de stimulation et de manière plus rapprochée en fin de stimulation, ce qui permettait d'adapter le traitement en fonction de la réponse ovarienne et de programmer le jour du déclenchement.

Le jour et l'horaire de déclenchement de l'ovulation étaient déterminés en réunion clinico-biologique. Pour ce faire, la patiente recevait une injection d'hCG recombinante (Ovitrelle® Merk Serono, Suisse) ou en cas de syndrome d'hyperstimulation ovarienne ou de signe de lutéinisation précoce : un analogue de la GnRH (Décapeptyl®, Ipsen Pharma, France). Les critères de déclenchement était l'obtention d'au moins 3 follicules de diamètre supérieur à 17 mm.

La ponction ovocytaire sous échographie transvaginale était réalisée au bloc opératoire à la 36^{ème} heure. À la réception de la ponction, les complexes cumulo-ovcytaires étaient récupérés sous loupe avec une micropipette et déposés dans 0,5 mL de milieu de culture G-IVF™ *plus* (Vitrolife®, Göteborg, Suède).

Trois heures après, l'ensemble des ovocytes était inséminé par FIV ou par ICSI selon la qualité du sperme recueilli (OMS, 2010). Lorsque la précédente tentative de FIV avait pour résultat peu ou pas d'ovocytes fécondés par rapport aux ovocytes recueillis, la moitié des

ovocytes étaient mis en fécondation par FIV et l'autre par ICSI. Les spermatozoïdes pouvaient provenir d'une congélation de sperme (don de sperme ou cryoconservation) ou d'un recueil de sperme le jour de la ponction.

Les ovocytes étaient ensuite placés individuellement en culture dans une goutte de 30 microlitres d'un milieu G-1TMplus (Vitrolife® Göteborg, Suède) recouvert d'huile de paraffine. L'ensemble était mis en culture dans une étuve à 37°C sous atmosphère contrôlée à 6% de CO₂ et 5% d'O₂ ou dans l'Embryoscope[®] (Unisense Fertilitech, Aarhus, Danemark). Cet automate permettait l'incubation dans les mêmes conditions atmosphériques et un suivi du développement par la saisie d'images toutes les 15 minutes. La fécondation était confirmée 19h après, par la présence de deux PN et d'un deuxième globule polaire expulsé.

Au troisième jour, les embryons de bonne qualité étaient placés dans une goutte de 30 microlitres de milieu G-2TMplus (Vitrolife® Göteborg, Suède) recouvert d'huile de paraffine.

L'évaluation de la qualité des blastocystes était réalisée quotidiennement de J4 à J6 en double lecture par un biologiste et/ou un technicien expérimenté selon les critères de Gardner et Schoolcraft (Gardner et al. 2000). Les blastocystes étaient notés selon la qualité de leur bouton embryonnaire (BE), de leur trophoctoderme (TE) et du degré d'expansion du blastocœle (figure 6).

D. Stratégie du transfert frais

Un transfert différé (« freeze all ») était décidé pour les patientes avec un taux de progestérone supérieur à 1,5ng/ml le jour du déclenchement (Xu et al. 2012) (Hill et al. 2015). De même pour les patientes avec un risque élevé de syndrome d'hyperstimulation ovarienne. Dans ce cas tous les embryons étaient cryoconservés après 5 ou 6 jours de culture au stade blastocyste.

Le transfert d'un blastocyste de bonne qualité à J5 était privilégié pour la majorité de nos patientes. Les patientes jugées de mauvais pronostic, au vu de leur âge >36 ans, du déroulement des précédentes tentatives et du nombre d'ovocyte fécondé à J1 (< à 3) pouvaient bénéficier le lendemain de la ponction, du transfert d'un ou deux embryons à un stade clivé de développement. Les embryons surnuméraires étaient vitrifiés à J5 ou J6 permettant leurs utilisations lors d'un prochain cycle.

E. Caractéristiques du cycle de transfert congelé

- **La congélation des blastocystes**

Le kit RapidTMVit Blast (Vitrolife® Göteborg, Suède) était utilisé pour la vitrification des blastocystes, selon la procédure recommandée par le fournisseur. Après des bains successifs en cryoprotecteurs, les blastocystes étaient placés dans une paillette haute sécurité et plongé directement dans l'azote liquide (figure 8). Les embryons ont été cryoconservés dans des paillettes de vitrification hautes sécurités (Vitrolife® Göteborg, Suède) garantissant une séparation physique de l'azote liquide. Ils ont été vitrifiés un par un pour garantir le respect des temps d'incubation et permettre le transfert d'embryon unique.

- **La préparation endométriale :**

La préparation de l'endomètre par un cycle substitué a majoritairement été appliquée dans notre centre. Le premier temps avait pour objectif une prolifération de l'endomètre sous imprégnation oestrogénique (Provames® , Sanofi-Aventis, France 1 comprimé 2 fois par jour ; Vivelle-Dot® patch Novartis Pharma, France, 2 patch 75 microgramme tous les 3 jours). Le second temps débutait lorsque l'épaisseur de l'endomètre était supérieure à 8 mm par l'ajout de progestérone intravaginale (Utrogéstan®, Besins International, France 200mg 1 capsule matin et 1 capsule le soir).

Le transfert était réalisé au 7^{ème} jour du traitement par progestérone. Ce traitement était adapté puis poursuivi pendant 11 jours après le transfert et pendant 12 semaines en cas de grossesse.

- **Le réchauffement et transfert embryonnaire**

La décongélation des blastocystes vitrifié à J5 se faisait le matin même du transfert ou la veille du transfert selon le degré d'expansion du blastocyste lors de la congélation. Pour les blastocystes vitrifiés à J6, la décongélation se faisait le jour même. Le protocole de réchauffement était celui décrit pour le kit RapidTM Warm Blast (Vitrolife® Göteborg, Suède). Après avoir été retiré de la paillette, le blastocyste était placé pendant 2 minutes dans le milieu Warm 1TM Blast, puis 3 minutes dans le milieu Warm 2TM Blast et enfin 5 à 10 minutes dans le milieu Warm 3TM Blast. Ces milieux étaient pré-équilibrés à 37°C. Les milieux Warm 1TM Blast et Warm 2TM Blast contenaient du sucrose comme cryoprotecteur alors que le 3^{ème} milieu n'en contenait pas.

Immédiatement après le réchauffement, les blastocystes étaient évalués en fonction de leur morphologie expansés, rétractés ou lysés. Si le blastocyste était lysé, un autre embryon était immédiatement décongelé en fonction des disponibilités.

La culture était poursuivie dans un milieu G2 Plus (Vitrolife® Göteborg, Suède) et placé dans une étuve à 37°C sous atmosphère contrôlée à 6% de CO₂ et 5% d'O₂ jusqu'au moment du transfert. Le choix de transférer un ou deux blastocystes était décidé préalablement au vu de l'âge de la patiente, d'une éventuelle contre indication à la grossesse gémellaire, du nombre de blastocyste restant et du déroulement des précédents cycles.

Le transfert de l'embryon était réalisé au moyen d'un cathéter souple incurvé (Cook®, Bloomington, USA), sous guidage échographique dans l'utérus de la patiente ou d'un cathéter muni d'un mandrin métallique (setTDT®) lorsque la cathétérisation du col pour le transfert de l'embryon était difficile.

Un dosage quantitatif de β hCG était réalisé à 11 jours et 13 jours après le transfert. Lorsque le test était confirmé positif, une échographie obstétricale entre 4 et 5 semaines permettait d'authentifier une grossesse clinique par la présence d'un sac gestationnel intra-utérin ainsi que la présence d'une activité cardiaque. Les naissances vivantes étaient rapportées par les parents ou les médecins ayant suivi la grossesse au centre d'AMP et renseignées dans le dossier informatique du couple.

F. Recueil des données :

Les données ont été extraites rétrospectivement de la base de donnée Médifirst® et à partir des dossiers papiers.

• Caractéristiques des populations :

Les données suivantes ont été recueillies :

Pour la population féminine :

-Age, Poids, l'indice de masse corporelle (IMC), le taux d'hormone anti mullérienne (AMH, Immunotech, MIS, Beckman Coulter),

-Le nombre de patientes avec une concentration sérique d'AMH

- Inférieur à 1,5 ng/ml
- Entre 1,5 et 5 ng/ml
- Supérieur à 5 ng/ml

-L'oestradiolémie et la concentration sérique de FSH (mUI/mL) à J3 (Cobas®, électrochimiluminescence ECLIA, Roche)

-Il était également recueilli : le statut ovulatoire (normal, dysovulatoire, anovulatoire), l'intoxication tabagique (actif, sevré, jamais) et les causes de l'infertilité féminine: (mixte, syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), endométriose, insuffisance ovarienne primitive (IOP), tubaire et les troubles ovulatoires).

Pour la population masculine : nous avons recueillis les antécédents d'intoxication tabagique (actif, sevré ou jamais), la présence ou non d'anomalies importantes du spermogramme selon les critères de l'OMS 2010 rendant impossible la FIV classique.

Pour le couple, nous avons recueillis les causes de l'infertilité (causes masculines, causes féminines ou causes mixtes).

- **Caractéristiques du cycle de FIV :**

Les données suivantes ont été recueillies :

Le rang de la tentative en AMP.

La posologie de départ en gonadotrophine

L'utilisation ou non d'un protocole antagoniste

Le nombre de jours total de stimulation

La dose totale de gonadotrophines

L'oestradiolémie (pg/ml) le jour du déclenchement par hCG ou agoniste de la GnRH.

Stratégie de mise en fécondation des ovocytes recueillis : FIV classique, ICSI, les deux (moitié FIV –moitié ICSI)

L'issue du cycle de transfert frais (si transfert frais):

- Test de grossesse négatif ($\beta hCG=0$) ou positif ($\beta hCG \neq 0$) déterminé au 11^{ème} jour post transfert ou au 13^{ème} jour ;

- Naissance ou pas d'un enfant.

- Transfert différé : « freeze all »

- Le nombre de blastocystes vitrifiés à J5

- **Caractéristiques du blastocyste transféré**

Les données suivantes ont été recueillies :

Le jour de vitrification du blastocyste J5 ou J6

La date de réchauffement du blastocyste: le jour du transfert (J) ou la veille (J-1)

Le degré d'expansion du blastocyste, du bouton embryonnaire (BE) et du trophoectoderme (TE) selon la classification de Garner et Schoolcraft (figure 6)

Le caractère expansé ou rétracté du blastocyste au moment du transfert

- **Caractéristiques du cycle de transfert d'embryon congelé**

Les données suivantes ont été recueillies :

Le rang de la tentative de transfert d'embryon congelé

La durée du traitement par oestradiol avant l'introduction de la progestérone

La durée totale de traitement par oestradiol

La durée de traitement par l'association oestradiol et progestérone avant le transfert

L'épaisseur de l'endomètre au jour de l'ovulation

G. Critères de jugement

Le critère de jugement principal était le taux de naissance vivante (TNV) défini par le nombre d'accouchement ayant abouti à au moins un enfant vivant exprimé par 100 cycles initiés de décongélation. Le critère de jugement secondaire était le taux de grossesse clinique par cycle de décongélation (TGC) défini comme le nombre de grossesses avec la présence d'un sac gestationnel ou plus objectivé à l'échographie transvaginale incluant les grossesses extra utérines (GEU) (Zegers-Hochschild et al. 2009). Le taux d'implantation était défini comme le nombre de sacs gestationnels observés divisé par le nombre d'embryons transférés (Zegers-Hochschild et al. 2009).

H. Analyses statistiques

Un test-t de Student a été réalisé sur les variables continues pour comparer les moyennes. Les variables qualitatives ont été analysées par un test de Fisher exact afin d'évaluer leurs indépendances. Nous avons mené une analyse de régression logistique automatisée (« stepwise ») sur les cycles de transfert d'un seul embryon: «*single embryo transfer*» (SET). Pour notre modèle de régression logistique nous avons choisis les paramètres à analyser en fonction de leur pertinence et en fonction d'un degré de significativité p

inférieur à 0,1 des différentes analyses comparatives réalisées. La variable dépendante était une naissance après transfert de blastocyste vitrifié. Le logiciel de statistique MedCalc® version 16.2.1 (MedCalc Software, bvba, Ostend, Belgium) a été utilisé pour l'ensemble de ces analyses statistiques. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

III. Résultats

A. Flowchart des issues cliniques et survies immédiates après 775 cycles de décongélation.

Au total, 775 cycles de décongélation d'embryon vitrifié au stade blastocyste à J5 ou J6 ont été réalisés. La figure 11 présente la répartition de ces cycles.

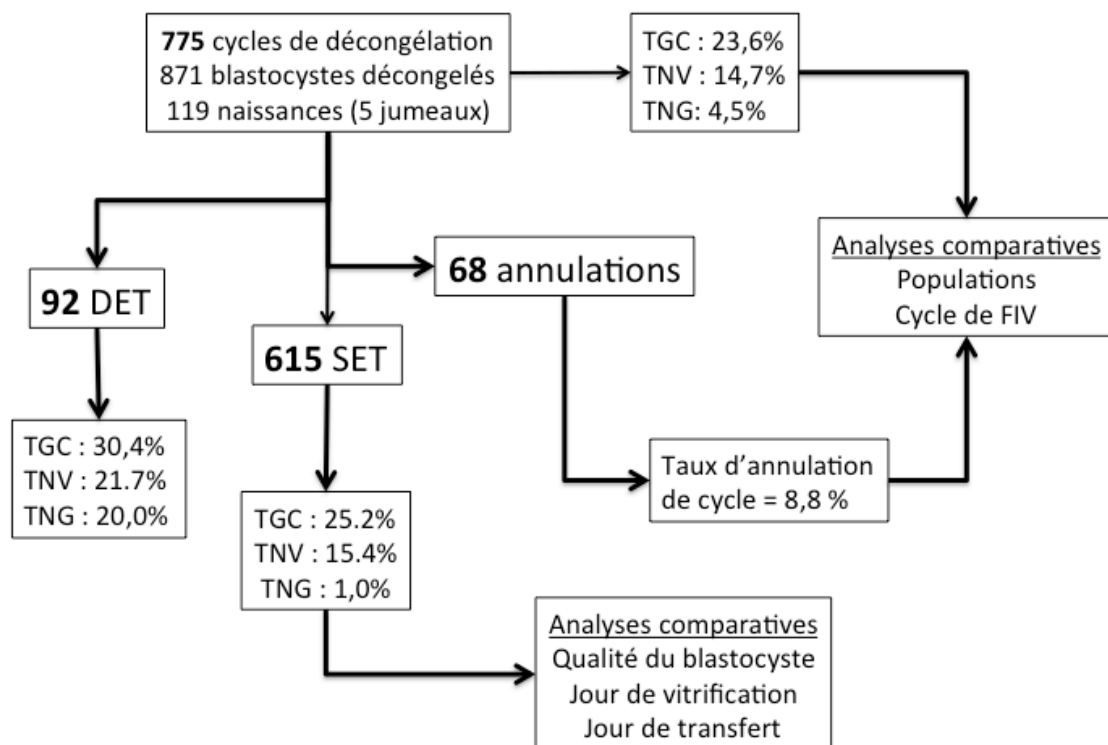


Figure 11 : Répartition des 775 cycles de décongélation de blastocystes vitrifiés.

SET : Single Embryo Transfer ; DET : Double Embryo Transfer ; TGC : Taux de grossesse clinique ; TNV : Taux de naissance vivante ; TNG : Taux de naissance gémellaire;

Nous avons décongelé 871 blastocystes. Pour 615 cycles, il s'agissait du transfert d'un seul embryon (SET) alors que pour 92 cycles, nous avons transféré 2 blastocystes (*double embryo transfer* (DET)). Le taux de β hCG positif (valeur supérieure à 100UI/L) était de 24,3% (188/775). Le taux d'implantation était de 23,8% (190/799) et le taux de grossesse clinique par cycle de décongélation était de 23,6% (183/775). Le taux de naissance vivante

par cycle de décongélation était de 14,7% (114/775). Le sexe ratio était de 1.07 garçon pour 1 fille. Le taux de naissance gémellaire était de 4,5% (5/114).

Pour les cycles de SET, le taux de grossesse clinique et de naissance vivante était de 25,2% (155/615) et 15,4% (95/615) respectivement. Nous avons constaté qu'une seule naissance gémellaire dans ce groupe.

Pour les cycles de DET, le taux de grossesse clinique et de naissance vivante était de 30,4% (28/92) et de 21,7% (20/92) respectivement. Il y a eu 5 grossesses gémellaires donnant 8 enfants. Le taux de grossesse gémellaire était de 17,9% (5/28) et le taux de naissance gémellaire était de 20,0% (4/20).

Pour 68 cycles, le transfert n'a pas été réalisé du fait d'une lyse embryonnaire lors du réchauffement. Le taux de cycle annulé pour lyse complète était de 8,8% (68/775). Le taux de survie après décongélation était de 91,7% (799/871).

B. Caractéristiques des populations

Les caractéristiques des populations féminines sont rapportées dans les tableaux I à IV. La moyenne d'âge des patientes était de 32.6 ans (de 22 à 45 ans).

A partir de 39 ans, les femmes avaient significativement moins de naissance après transfert d'un blastocyste vitrifié (tableau II). Le taux d'AMH n'était pas corrélé significativement à un taux de naissance plus élevé après TEV (tableau I et III).

Tableau I: Issues en fonction des caractéristiques de la population féminine *

Population féminine	Ensemble n= 775	Absence de naissance n=661	Naissance n=114(14.7%)	p
Age (en année)	32,6 +/- 4,1	32.6 +/-4.2	32.7+/-3.4	NS
Poids (kg) :	62,8 +/- 12,6	63.1+/-12.5	61.3+/-12.8	NS
IMC (kg/m²)	23,28 +/- 4,5	23.4+/-4.5	22.7+/-4.2	NS
AMH (ng/ml)	5.37 +/-4.5	5.3 +/-4.2	5.5+/-6.2	NS
FSH (mUI/mL)	6,61 +/-2.52	6.6 +/-2.6	6.5+/-1.9	NS
E2 (pg/ml)	42.17 +/-38.4	42.4+/-40.1	40.1+/-26.8	NS

*Les données sont des moyennes et écarts types ; NS : non significatif

Tableau II: Issues en fonction de l'âge féminin *

Age féminin (années)	Ensemble n=775	Absence de naissance n=661	Naissance n=114 (14.7%)	P
Age <35	538	460	78 (14,50%)	NS
Age ≥35	237	201	36 (15,19%)	
Age (35-39)	195	161	34 (17,43%)	
Age < 37	637	538	99 (15.54%)	0.0990
Age ≥37	138	123	15 (10.86%)	
Age < 39	733	621	112 (15,27%)	
Age ≥ 39	42	40	2 (4,76%)	0.00385

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage)

Tableau III : Issues en fonction du taux d'AMH *

Patientes avec AMH J3(ng/ml)	Ensemble n=775	Grossesse clinique n=183 (23.6%)	P	Naissance n=114 (14.7%)	P
<1.5	61	14 (22.9%)	0.4980	11 (18.03%)	0.4508
[1.5-5[	378	88 (23,28%)	NS	52 (13.76%)	NS
≥5	294	70 (23,8%)	NS	45 (15.31%)	NS
NC	42	9 (21,42%)	NS	6 (14.29%)	NS

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage)

Tableau IV: Issues en fonction du statut ovulatoire *

Statut ovulatoire	Ensemble (n=775)	Naissance n=114 (14.7%)	p
Dysovulation, anovulation	540 (69.55%)	80(14.81%)	NS
Ovulation normale	205(26.45%)	29 (14.14%)	
Données manquantes	30	5	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage)

Tableau V: Issues en fonction des indications *

Indications	Ensemble n=775	Grossesse n=183 (23.6%)	P	Naissance n=114(14.7%)	p
Masculine seule	110	32 (29,1%)	0,0920	18 (16,4%)	0.3431
Non masculine seule	665	151 (22,7%)		96 (14.4%)	
Mixte (H+F)	321	68 (21,2%)	0,1048 [‡]	48(14,9%)	NS [‡]
Idiopathique	41	4			
Données manquantes	2	2			
Feminine seule	301	77 (25,6%)	NS [§]	48 (15,6%)	NS [§]
Troubles ovulatoires [†] (dysovulation, anovulation)	171	43 (25,1%)	NS	29 (16,9%)	0,2050
SOPK	57	17 (29,8%)	0,1619 ^{II}	6(10,5%)	NS ^{II}
Endométrioses	24	3 (12.5 %)	0.5908	1 (4,1%)	NS
Tubaires pures	49	9 (18.38%)	NS	7 (14,28%)	NS
Etiologie féminine mixte	24	5 (12.9%)	NS	5 (12,9%)	NS

* Les données sont des effectifs (avec pourcentage) ; [†] Trouble ovulatoire sans autres étiologies, [‡] Comparaison des indications mixtes contre non mixtes ; [§] Comparaison des indications féminines contre non féminines, ^{II} : Comparaison des indications pour SOPK contre absence de SOPK ; SOPK : syndrome des ovaires polykystiques

Les données concernant les indications de la prise en charge en AMP sont rapportées dans le tableau V. L'indication était pour 48,7% (352/723) féminine, 14,0% (101/723) masculine et pour 37,3% (270/ 723) mixte. Une indication masculine était associée à un nombre de grossesse clinique plus élevé avec un p non significatif ($p=0,0920$) sans l'être pour le nombre de naissance vivante (tableau V). Les étiologies féminines étaient l'insuffisance ovarienne, les dysovulations, les syndromes des ovaires polykystiques, les étiologies tubaires, et l'endométriose. Parmi ces étiologies aucune n'était significativement associée à l'issue de TEV (tableau IV et V).

Une histoire d'intoxication tabagique active, sevrée ou passive n'était pas associée significativement à une grossesse ou à une naissance après TEV (tableau VI).

Tableau VI : Issues en fonction de l'intoxication tabagique*

TABAC couple	Ensemble n=775	Grossesse n=183 (23.6%)	P	Naissance n=114 (14.7%)	P
Actif	283	64 (22,6%)	NS	45 (15.9%)	NS
Sevré	136	29 (21,32 %)	NS	20 (14.7%)	NS
Jamais	244	54 (22.1%)	0.2276	32 (13.11%)	NS
Données manquantes	112	36(32,1%)		17 (15,2%)	
TABAC Femme					
Actif	115	25 (21,7%)	0,3516	18 (15.6%)	NS
Sevré	150	41 (27.3%)	0,1387	28 (18,7%)	NS
Jamais	493	114 (23,1%)	0.2276	67 (13.6%)	NS
Données manquantes	17	3 (17.6%)		1 (5,8%)	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage)

C. Caractéristiques du cycle de FIV/ICSI

Les caractéristiques du cycle de stimulation n'ont pas pesées significativement sur le taux de grossesse clinique ni sur le taux de naissance (Tableau VII). Un protocole antagoniste a été utilisé dans 95,7% des cycles de stimulation. Les patientes ont en moyenne été stimulées pendant 9,8 jours (7 à 15 jours). La posologie moyenne de départ était de 233,8 UI (min : 75 à max : 450UI). Le nombre moyen d'ovocytes matures recueillis était de 10,6 (2 à 35). La moyenne des ovocytes fécondés à J1 était de 7,3 (0 à 28) et le taux de

fécondation était de 68%. Il y a eu 399 transferts d'embryon frais au stade blastocyste et 72,7% (290) avaient un grade cumulé du bouton embryonnaire et du trophoctoderme supérieur à BB (AA, AB ou BA);

D. Stratégie de mise en fécondation de l'ensemble des ovocytes recueillis

La FIV classique a été utilisée en majorité pour la mise en fécondation 59,6% (462/775). Les taux de grossesse et de naissance étaient globalement plus élevés en ICSI sans être statistiquement significatifs ($p= 0,0669$ et $0,06627$ respectivement) (tableau VIII).

Tableau VII Issues en fonction du cycle de stimulation ovarienne*

	Ensemble n=775	Grossesse n=183(23.6)	p	Naissance n=114(14.7%)	p
N° d'ordre AMP	1.48+/-0.78	1.53+/-0.85	NS	1.51+/-0.8	NS
Posologie de départ	233,9 +/-79.0	238.58 +/-82.3	NS	234.1+/-84.8	NS
Nombre total de jours de stimulation	9.8 +/- 1.4	9.8+/- 1.2	NS	9.8+/-1.1	NS
Dose totale de gonadotrophine (UI)	2300 +/-899	2328+/-925.5	NS	2293+/-947.5	0.9302
Taux E2 jour hCG	2668 +/- 1331	2824+/-1396	NS	2845+/-1399	0.2223
Protocole antagoniste	742 (95,7%)	145 (19.54%)	NS	109 (14.69%)	NS

* Les données sont des effectifs (avec pourcentage) ou des moyennes +/-écarts types

Tableau VIII : Issues en fonction de la stratégie de mise en fécondation de l'ensemble des ovocytes.

	Ensemble 775	Grossesse n=183(23.6%)	P	Naissance n=114 (14.7%)	p
FIV classique	462	103 (22,3%)	0,1675 [†] 0,0918[‡]	60 (12.99 %)	0.1495 [†] 0,0571[‡]
ICSI	267	72 (26,9%)	0,0669	47 (17.60%)	0,0627
Mixte (mi FIV mi ICSI)	46 (5.9%)	8 (17.4%)	NS	7 (15.22 %)	NS

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage) ; [†] Comparaison entre FIV classiques contre ICSI ou Mixte ; [‡] Comparaison entre FIV et ICSI ;

E. Stratégie de transfert différé avec « freeze all »

Une stratégie consistant différer le transfert et à congeler tous les embryons de bonnes qualités issues d'une FIV ou d'une ICSI (« freeze all ») a donné des taux de naissances significativement plus importants (tableau IX). Les blastocystes issus d'une stratégie de « freeze all » étaient vitrifiés dans 53,1% des cas à J5 et 46,9% à J6. Cette répartition de J5/J6 n'était pas significativement différente du groupe sans freeze all ($p=0,2835$) (tableau X). Pour 60,4% (122/202) de ces cycles il s'agissait du premier transfert après décongélation (rang 1) et le taux de naissance 23,8% (29/122) n'était pas significativement différent des autres rangs 17, 5% (14/80) $p=0,1875$.

Tableau IX : Issues en fonction de la stratégie de transfert différé (« freeze all »)*

	Ensemble 775	Grossesse n=183(23.6%)	P	Naissance n=114 (14.7%)	p
Pas de transfert frais (« freeze all »)	202	50 (24.75%)	0,3616	43 (21.29%)	0.0020

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage)

Tableau X: Analyses des facteurs confondants entre « freeze all », jour de congélation et qualité du blastocyste.

	Ensemble 615	Pas de « freeze all » n=440 (71,5%)	« freeze all » n=175 (28,5%)	p
J5	304	211	93 (30,6%)	0.2835
J6	311	229	82(26,4%)	
Blastocyste AA ou AB ou BA	337	238	99 (29,4%)	0,8509
Non (AA et AB et BA)	278	202	76(27,3%)	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage)

F. Issues du cycle frais

L'issue du cycle frais à savoir un test de grossesse positif ou la naissance d'un enfant lors du cycle de FIV n'était pas prédictive de naissance lors du TEV (tableau XI).

Les blastocystes provenant d'une cohorte de plus de 3 blastocystes vitrifiés à J5 ne donnaient pas significativement plus de naissance après transfert (tableau XII).

Tableau XI: Issues en fonction de l'issue du transfert frais*

Issues du transfert frais	Ensemble n=775	Pas de naissance	Naissance n=114 (14.7%)	p
β HCG = 0	612	522	90(14.70%)	0.5405
β HCG $\neq$ 0	163	139	24(14.72%)	
Naissance -	744	636	108 (14.51%)	0.2984
Naissance +	31	25	6 (19.35%)	
(après exclusion des cycles de « freeze-all »)	n=573	502	71 (12,4%)	
Naissance -	543	478	65	0,1541
Naissance +	30	24	6	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage)

Tableau XII : Issues en fonction du nombre de blastocystes vitrifiés à J5 disponible dans la cohorte*

Nombre de blastocystes vitrifiés à J5	Ensemble n=775	Pas de naissance	Naissance n=114 (14.7%)	p
Blastocystes vitrifiés J5 <3	620	533	87 (14.03%)	0.1735
Blastocystes vitrifiés J5 $\geq$ 3	155	128	27 (17.41%)	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage)

G. La qualité embryonnaire

La qualité des embryons était évaluée dans le groupe SET. Une vitrification d'un blastocyste à J5 était associée à davantage de grossesse et de naissance comparativement à une vitrification à J6 (tableau XIII). Le jour de réchauffement avant transfert (la veille ou le jour du transfert) n'a pas eu d'effet significatif sur ces résultats (tableau XIII).

Tableau XIII : Issues en fonction du jour de vitrification et de réchauffement *

Jour de vitrification n=615	Grossesse clinique n=155 (25,2%)	P	Naissance n=95 (15,4%)	p
Blastocyste vitrifié à J5 n=304	82 (27,0 %)	0.0001	63 (20,7%)	0.0002
Blastocyste vitrifié à J6† n=311	45(14,5%)		32 (10,3%)	
Jour de Réchauffement (J5) n=304				
Blastocyste vitrifié à J5 et réchauffé le jour J du TEV n=160	41(25,62%)	0.3370	31(19,7%)	0.3731
Blastocyste vitrifié à J5 et réchauffé à J-1 du TEV n=144	41(28,47%)		31(21,53%)	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage) ; †Les blastocystes vitrifiés à J6 sont réchauffés le jour du transfert ; TEV : transfert d'embryon vitrifié

La vitrification d'un blastocyste en cours d'éclosion (B5) ou éclos (B6) était négativement associée à une naissance ($p=0,0194$) (tableau XIV). Cependant nous n'avions pas constaté d'augmentation de lyse de ces blastocystes lors de la décongélation (tableau XV). Il existait tout de même un facteur de confusion puisque ces embryons ont majoritairement (76,5%) été vitrifiés à J6 (tableau XVI). Nous n'avions pas constaté de différence significative en terme de grossesse clinique 20,8 % (5/24) ou de naissance 12,5 % (3/24) lorsque ces blastocystes étaient vitrifiés à J5 comparativement aux autres blastocystes ($p=0,4102$; 0,4777 respectivement). Les blastocystes B5 ou B6 vitrifiés à J6 avaient un taux de

naissance de 7,7% (6/78) significativement plus faible que les autres blastocystes ($p=0,0253$).

De plus, la vitrification à J5 d'un blastocyste avec un degré d'expansion noté B1 à B4 était associée à davantage de naissance comparativement à une vitrification à J6 : respectivement 21,4% (60/280) et 11,2% (26/233) $p=0,0013$.

Tableau XIV : Comparaison des issues en fonction de l'expansion du blastocyste après réchauffement *

Expansion de la cavité [†]	Ensemble n=615 [‡]	Pas de grossesse n=460	Grossesse n=155 (25,2%)	p	Pas de naissance n=520	Naissance n=95(15.4%)	p
1 et 2	79	55	24 (30,4%)	0,1594	65	14 (17.72%)	0.3244
3	140	108	32 (22,9%)	NS	119	21 (15,00%)	NS
4	292	215	77 (26,4%)	NS	242	50 (17.12%)	NS
5 et 6	102	81	21 (20,6%)	0,1463	93	9 (8.8%)	0,0255
1 et 2	79	55	24 (30,4%)	0,2048	65	14 (17.72%)	0.4247
3 et 4	432	323	109(25.23%)		361	71 (16.43%)	
3 et 4	432	323	109(25.23%)	0.1975	361	71 (16.43%)	0.0325
5 et 6	102	81	21 (20,6%)		93	9 (8.8%)	
Pas de donnée	2	1	1		1	1	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage) ; † Selon la classification de Gardner et Schoolcraft 2010 ;

‡ Nombre de transfert d'un unique embryon SET (single embryo transfer)

Tableau XV: Taux de cycle annulé pour lyse complète en fonction de l'expansion du blastocyste*

Expansion de la cavité	Effectifs n=680 [†]	Nombre de cycle annulé pour lyse complète n=68 (10%)	p
1 à 4	567	57 (10,5%)	0.6031
5 et 6	111	9 (8.1 %)	
4	323	31 (9,6%)	
3	157	17 (10,8%)	
1 et 2	87	8 (9,2%)	
Pas de donnée	2	2	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage) ; †Nombre de cycles de décongélation d'un embryon unique (3 cycles annulés pour lyse complète de plus d'un blastocyste)

Le grade du bouton embryonnaire selon la classification de Gardner 2010(Gardner et al. 2000) était significativement associé à une naissance. Un grade A était supérieur à un grade B lui même supérieur à un grade C (tableau XVII).

De même, le grade du trophoctoderme selon la classification de Gardner 2010(Gardner et al. 2000) était significativement associé à une naissance vivante après TEV. Un grade A était supérieur à un grade B. Parmi les 4 blastocystes avec un grade de trophoctoderme C transférés, aucun n'avait donné d'issue favorable (tableau XVIII).

Tableau XVI: Comparaison du jour de congélation en fonction de l'expansion du blastocyste*

Expansion de la cavité	Effectifs n=615	Nombre de congélation à j5	Nombre de congélation à j6	p
1 à 4	511	280	231 (45.2%)	0.0001
5 et 6	102	24	78 (76.5%)	
4	292	93	199 (68.1%)	
3	140	109	31 (22.1%)	
1 et 2	79	78	1 (1.3%)	
Pas de donnée	2			

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage)

Tableau XVII: Comparaison des issues en fonction du grade du bouton embryonnaire (BE)*

BE	Ensemble (n=615)	Grossesse n=155 (25,2%)	p	Naissance n=95 (15.45%)	p
A	253	77 (30.4%)	0.0352	56 (22.13%)	0.0013
B	269	62(23,0%)		32 (11.89%)	
C	49	9 (18,4%)	0,0583 [†]	3 (6.67%)	0.0048 [†]
			0.3019 [‡]		0.0150 [‡]
Pas de donnée	44	5		4	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage); † Comparaison entre un grade C et A ;

‡Comparaison entre un grade C et B ; BE : Bouton embryonnaire

Tableau XVIII: Comparaison des issues en fonction du grade du trophectoderme (TE) *

TE	Ensemble n=615	Grossesse n=155 (25,2%)	p	Naissance n=95 (15.45%)	p
A	280	80 (28,6%)	0.1100	54 (19.3%)	0.0249
B	287	68 (23,7%)		37 (12.89%)	
C	4	0 (0%)	NS	0 (0%)	NS
Pas de donnée	44	5		4	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage) ; TE : Trophectoderme

Le caractère expansé ou rétracté évalué après décongélation n'était pas corrélé au taux de grossesse. Cependant, nous avons noté une diminution du nombre de naissance dans le groupe expansé sans que celle-ci soit statistiquement significative ($p=0,0635$) (tableau XIX).

Tableau XIX: Comparaison des issues en fonction du caractère expansé ou rétracté à la décongélation*

Expansé Rétracté	Ensemble (n=615)	Grossesse n=155(25,2%)	p	Naissance n=95(15.45%)	p
Expansé	246	63 (25,6%)	NS	31 (12.60%)	0.0635
Rétracté	342	87 (25,4%)		60 (17.54)	
Données manquantes	27	5		4	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage)

Les grades cumulés du bouton embryonnaire et du trophectoderme (BE/TE) étaient évalués dans les tableaux XX et XXI. Nous avons constaté que le taux de naissance diminuait fortement à partir d'un grade BB (tableau XX). Les grades cumulés AA ou AB ou BA avaient significativement plus de naissance que les autres embryons. La date de vitrification paraissait être un facteur confondant puisque les blastocystes avec un grade cumulé AA, AB ou BA étaient majoritairement vitrifiés à J5 (60,2%). Un blastocyste de grade cumulé BB était plus souvent 63,5%(115/181) vitrifié à J6 (tableau XXII).

Tableau XX : Taux de naissances en fonction de la qualité du bouton embryonnaire et du trophoctoderme (BE/TE)*

Qualité (BE/TE)	Ensemble n=615	Pas de naissance n=520	Naissance n=95 (15.45%)	p
AA	192	152	40 (20.83%)	0.2371
AB	61	45	16 (26.22%)	
AC	0	0	0	
BA	84	70	14 (16.67%)	
BB	181	163	18 (9.94%)	
BC	3	3	0	
CA	3	3	0	
CB	45	42	3 (6.66%)	
CC	1	1	0	
Pas de donnée	45	41	4 (8.89%)	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage) ; BE : Bouton embryonnaire ; TE : Trophoctoderme

Tableau XXI: Naissances en fonction de la qualité du bouton embryonnaire et du trophoctoderme (BE/TE)*

Qualité (BE/TE)	Ensemble n=615	Pas de naissance n=520	Naissance n=95 (15.45%)	p
AA ou AB	253	197	56 (22.13%)	0.0003
Autres	317	282	35 (11.04%)	
Pas de donnée	45	41	4 (8.89%)	
AA ou AB ou BA	337	267	70 (20.77%)	0.0001
Autres	233	212	21 (9.01%)	
AA ou AB ou BA ou BB	518	430	88 (16.98%)	0.0202
Autres	473	49	3 (0.63%)	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage), BE : Bouton embryonnaire, TE : Trophoctoderme

Tableau XXII: Naissance en fonction de la qualité des blastocystes : bouton embryonnaire/trophectoderme (BE/TE) et jour de vitrification J5 ou J6 *

Qualité (BE/TE) AA ou AB ou BA ou BB n= 518	Ensemble n= 518	Pas de naissance n=430	Naissance n=88 (16,98%)	p
J5	269	209	60 (22.3%)	0.0005
J6	249	222	28 (11.2%)	
AA ou AB ou BA n= 337	Ensemble n= 337	Pas de naissance n=267	Naissance n=70 (20,8%)	
J5	203	152	51(23,4%)	0,0102
J6	134	115	19(14,2%)	
BB n= 181	n= 181	n=163	n=18 (9,9%)	
J5	66	57	9 (13.6%)	0.1587
J6	115	106	9 (7.8%)	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage) ; BE : Bouton embryonnaire ; TE : Trophectoderme

H. Caractéristiques du cycle de transfert d'embryon congelé (TEC)

Nous avons observé une homogénéité dans les protocoles de préparation endométriale. Les transferts d'embryon ont été réalisés au 7^{ème} jour du traitement par progestérone dans 96% des cycles. La durée du traitement par oestrogène avant le transfert n'a pas été différente pour les cycles ayant eu une issue positive (tableau XXIII).

Tableau XXIII : Comparaison des issues en fonction des données du cycle de TEC *

Cycle de TEV	Ensemble n=775	Grossesse clinique n=155 (25,2%)	p	Naissance n=114 (14.7%)	p
Rang TEC	1.42+/-0.71	1.45 +/-0.78	NS	1.43+/-0.74	NS
Epaisseur de l'endomètre	8.72+/-1.80	8.67 +/-1.69	NS	8.64+/-1.77	NS
Durée du traitement par oestrogènes avant transfert	23.89+/-3.52	23.40+/-3.31	NS	23.50+/-3.19	NS
Durée du traitement par oestrogènes avant progestérone	17.91+/-3.52	17.42+/-3.31	NS	17.48+/-3.18	NS

* Les données sont des moyennes +/- écarts types ; TEV : Transfert d'embryon vitrifié

I. Études des cycles sans transfert pour lyse

Des 775 cycles de décongélation d'embryon vitrifié, nous avons dénombré 68 cycles n'ayant pas aboutis à un transfert d'embryon. L'analyse descriptive de ces cycles est présentée dans les tableaux XXIV à XXVIII. Un antécédent de tabagisme de la patiente donnait paradoxalement des taux de survie plus importants après décongélation sans être toutefois statistiquement significatif ($p=0.0916$). Une date de vitrification à J5 par rapport à J6 de développement embryonnaire avait globalement des taux plus importants de survie avec là encore un degré de significativité faible ($p=0.0840$) (tableau XXVIII).

Tableau XXIV: Comparaison de la possibilité de transfert congelé en fonction des caractéristiques de la population féminine.

	Ensemble n=775	Pas de transfert n=68	Transfert n=707	p
Age féminin (années)	32,6 +/- 4,1	32.57 +/-4.463	32.63+/-4.031	NS
Poids (kg)	62,8 +/- 12,6	63.87+/-11.59	62.69+/-12.69	NS
IMC (kg/m ²)	23,28 +/- 4,5	23.18+/-4.129	23.28+/-4.501	NS
AMH (ng/ml)	5.37 +/-4.5	5.830+/-4.451	5.324+/-4.557	0.3954
FSH (mUI/mL)	6,61 +/-2.52	6.483+/-1.961	6.627+/-2.568	0.6680
E2 (pg/ml)	42.17 +/-38.4	37.43+/-15.84	42.63 +/-39.84	0.316

* Les données sont des moyennes +/- écarts types

Tableau XXV : Comparaison de la possibilité de transfert congelé en fonction des antécédents de tabagisme maternel*

Tabac femme	Ensemble n=775	Pas de transfert n=68	Transfert n=707	P
Actif	115	9 (7.8%)	106 92.2%)	NS
Sevré	150	9 (6.0%)	141 (94.0%)	
Jamais	483	49 (10.1%)	444 (91.9%)	
Données manquantes	17	1	16	
JAMAIS	483	49 (10.1%)	444 (91.9%)	0.0916
ACTIF + SEVRE	265	18 (6.8%)	247 (93.2%)	

* Les données sont des effectifs (avec pourcentage)

Tableau XXVI : Comparaison de la possibilité de transfert congelé en fonction de l'âge de la patiente à la congélation.*

Age	Ensemble n=775	Pas de transfert n=68	Transfert n=707	p
<37	637	52	585 (91.8%)	0.1313
≥37	138	16	122 (88.4%)	
Age ≤39	733	64	669 (91.3%)	0.5130
Age > 39	42	4	38 (90.4%)	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage)

Tableau XXVII : Comparaison de la possibilité de transfert en fonction de la technique AMP *

Technique AMP	Ensemble n=775	Pas de transfert n=68	Transfert n=707	p
FIV	462	41	425 (92.0%)	0.5486
ICSI	267	23	240 (89.9%)	
MIXTE + DM [†]	46	4	42	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage)

[†] Données manquantes

Tableau XXVIII: Comparaison de la possibilité de transfert en fonction de la date de congélation J5/J6*

Date de congélation J5/J6	Ensemble N=775	Pas de transfert (n=68)	Transfert (n=707)	p
J5	369	27 (39,7%)	342 (92.7%)	0.0840
J6	383	40 (58,8%)	343 (89.5%)	
Mixte J5/J6	23	1	22	

*Les données sont des effectifs (avec pourcentage)

J. Analyse multivariée des facteurs prédictifs de naissance

Les variables incluses initialement dans notre analyse multivariée étaient : l'âge, l'utilisation d'une ICSI pour la fécondation, l'absence de transfert frais (« freeze all »), l'indication masculine, le transfert d'un blastocyste avec un grade de bouton embryonnaire et de trophoctoderme supérieur à BB, le degré d'expansion du blastocoèle inférieur à B5

avant vitrification et le caractère rétracté du blastocyste après décongélation. Les résultats de cette analyse sont exposés dans les tableaux XXIX et XXX. L'analyse par régression logistique simple a identifié 5 variables d'intérêt $p < 0,1$ (tableau XXIX). L'analyse de ces variables en régression logistique automatisée (« stepwise ») n'en a finalement retenue que trois statistiquement significatives, $p < 0,05$ (tableau XXX).

Tableau XXIX : Identification des facteurs prédictifs de naissance après TEV par régression logistique simple

Facteurs	Odds ratio ajusté	95% IC	p
Age	1,0074	0,9492 à 1,0692	0,8080
ICSI	1,3337	0,7096 à 2,5068	0,3711
Freeze All	2,0377	1,2243 à 3,3915	0,0062
J5	1,6545	0,9907 à 2,7632	0,0543
Masculine	1,2129	0,6503 à 2,2622	0,5438
Qualité BE/TE : AA ou AB ou BA	2,3067	1,3266 à 4,011	0,0031
Blastocoèle <B5	2,3067	1,1071 à 6,1466	0,0283
Caractère rétracté avant transfert	1,5547	0,9406 à 2,5699	0,0852

TEV : Transfert d'embryon vitrifié ; OR : odds ratio ; IC : intervalle de confiance ; p : degré de significativité en analyse multivariée. BE : bouton embryonnaire, TE : Trophectoderme

Tableau XXX : Identification des facteurs prédictifs de naissance après TEV par régression logistique automatisée (« stepwise »)

Facteurs	Odds ratio ajusté	95% IC	p
Freeze All	1,8799	1,1500 à 3,0731	0,0118
J5	1,8928	1,1518 à 3,1104	0,0118
Qualité BE/TE : AA ou AB ou BA	2,1524	1,2516 à 3,7013	0,0056

TEV : Transfert d'embryon vitrifié ; OR : odds ratio ; IC : intervalle de confiance ; p : degré de significativité en analyse multivariée. BE : bouton embryonnaire, TE : Trophectoderme

IV. Discussion

A. Principaux résultats

Par cette étude, nous avons pu déterminer trois facteurs prédictifs indépendants de naissance après transfert d'un blastocyste vitrifié:

- Un blastocyste issu d'une stratégie de transfert différé avec « freeze all »,
- Le transfert d'un blastocyste vitrifié à J5.
- Une qualité morphologique combinée du bouton embryonnaire et du trophodermes supérieur à BB lors de la vitrification,

Ces facteurs prédictifs étaient équivalents avec un odds ratio ajusté autour de 2 pour chacun d'entre eux dans le modèle de régression logistique automatisée (tableau XXX).

B. Limites de l'étude

Les résultats de cette analyse sont limités par sa nature rétrospective et monocentrique.

De plus nos résultats concernent uniquement les patientes pour lesquelles un blastocyste au minimum a été obtenu et cryoconservé lors d'une tentative de FIV. Ainsi, les patientes étaient indirectement sélectionnées en fonction de leur aptitude à produire des embryons évoluant jusqu'au stade blastocyste. De plus les patientes ayant eu une issue favorable pendant la période ont été peu représentées. Elles ont dû repousser l'utilisation de leurs embryons cryoconservés d'au moins une année, du fait de leur grossesse.

C. Le transfert différé

Nous avons constaté une corrélation positive entre un transfert différé et une issue favorable après transfert de blastocyste vitrifié.

Une première explication serait le fait de pouvoir disposer du meilleur blastocyste issu de la cohorte pour le transfert d'embryon vitrifié au lieu du « deuxième meilleur embryon » lorsqu'il y a eu un transfert frais (Shapiro B et al. 2014a) (Roque et al. 2013). Ceci est étayé dans notre étude par l'augmentation non statistiquement significative des taux de naissance pour les patientes bénéficiant d'une première tentative de transfert d'embryon (23,8%) comparativement aux autres tentatives (17,5%) lorsqu'il s'agissait d'une stratégie de « freeze all » ($p=0,1875$).

Une autre hypothèse viendrait d'un biais de confusion lié à l'indication du « freeze all ». Les indications sont résumées dans le tableau XXXI. Dans notre centre d'AMP, le transfert différé était réalisé principalement dans le but de prévenir le syndrome d'hyperstimulation ovarienne ou lorsqu'il y avait une élévation prématurée de la progestérone. Il s'agissait de patientes hyper répondeuses. La réceptivité endométriale est pour ces patientes altérée du fait d'une élévation excessive des hormones en fin de phase folliculaire, ce qui est résolu par le transfert différé (Shapiro B et al. 2011) (Shapiro B et al. 2014a). Cette hypothèse suggère soit une meilleure qualité des blastocystes issus des patientes hyper répondeuses bénéficiant d'un transfert différé, soit une meilleure réceptivité après une préparation endométriale optimale de ces patientes.

Les patientes ayant bénéficié d'un protocole de « freeze all » ont pour la plupart reçu un agoniste de la GnRH (Décapeptyl®) pour induire l'ovulation lors du cycle frais. Ce traitement réduit fortement l'incidence des SHO modérées et sévères au prix d'un taux de grossesse diminué par rapport à l'hCG en transfert frais (Youssef et al. 2014). Cependant, certains auteurs ont suggéré une amélioration de la maturation ovocytaire, de la fécondation et par conséquent du nombre de blastocystes de qualité formés après induction de l'ovulation par un agoniste de la GnRH (Bosch et al. 2016)(Humaidan et al. 2005). Les résultats d'une étude ont montré des taux de naissances plus importants lors d'un transfert différé de blastocystes issus d'un déclenchement par agoniste de la GnRH : 30,0 % (IC à 95% , de 14,5 à 51,9) par rapport au déclenchement par hCG : 18,5% (IC à 95 %, de 8,2 à 36,7) sans être statistiquement significatifs (Griesinger et al. 2007). Mais les résultats des différentes études demeurent très irréguliers comme le montre la méta-analyse du même auteur (Griesinger et al. 2006). Nous n'avons pas trouvé dans notre étude de différence significative entre la qualité des blastocystes transférés dans les deux groupes (tableau X). Un nombre élevé de blastocystes vitrifiés n'était pas associé à un taux de naissance plus élevé dans notre étude (tableau XII).

Parmi les indications du « freeze all », le transfert différé de façon systématique est proposé comme une stratégie alternative au transfert frais (Shapiro B et al. 2014a)(Roque et al. 2015a) (Blockeel et al. 2016). Le principal avantage de cette stratégie est qu'il règle le problème des autres indications du « freeze all » tout en maintenant des taux de naissance cumulé équivalents sinon meilleurs (Roque et al. 2013). Cette stratégie permettrait d'homogénéiser la prise en charge clinique et le traitement au sein du laboratoire, le suivi

du cycle de ponction serait aussi moins contraignant (absence de surveillance de la progestéronémie)(Blockeel et al. 2016).

Tableau XXXI : Indications du transfert différé (« freeze all »)

Prévention du risque d'hyperstimulation ovarienne (Boothroyd et al. 2015)
Elévation prématurée du taux de progestérone plasmatique (Healy et al. 2015)
Après échec d'implantation lors d'une première tentative de FIV (Shapiro B et al. 2014b)
Diagnostic préimplantatoire (Huang et al. 2015)
Screening préimplantatoire des embryons euploïdes (Taylor et al. 2014)(Kort et al. 2015)
Raisons personnelles ou organisationnelles
Systématique (Blockeel et al. 2016)(Roque et al. 2015b)(Shapiro B et al. 2014a)

Pour les patientes, cette stratégie permettrait d'espacer le temps entre la ponction et le transfert et donc d'améliorer les conditions psychologiques du transfert. De plus, les conditions hormonales supra physiologiques après un transfert frais ont un retentissement négatif sur les résultats obstétricaux et néonataux. Il existe un risque accru de pré-éclampsie, de prématurité, d'hypotrophie, et de mort périnatale par rapport au transfert congelé (Maheshwari et al. 2012) (Roque 2015).

Il existe dans la littérature peu de recul sur cette stratégie. D'autres essais cliniques randomisés contrôlés seront nécessaires pour établir un changement complet dans notre politique de transfert.

D. Le jour de vitrification

La blastulation des embryons se produisant habituellement à J5, lorsqu'elle est retardée au sixième jour, nous avons constaté une réduction des taux de naissances. Cette diminution était indépendante du jour du transfert (tableau XIII, XXX). Ce résultat confirme ceux déjà observés en cycle frais (Shapiro B et al. 2001) (Elgindy et Elsedeeek 2012) et en cycle congelé (Shoukir et al. 1998)(Levens et al. 2008). Cependant, ils sont en contradiction avec les données plus récentes sur les transferts d'embryons congelés(Shapiro B et al. 2008)(Richter et al. 2006)(Shapiro B et al. 2013).

Dans notre étude les blastocystes vitrifiés à J5 étaient pour la moitié réchauffés la veille du transfert (tableau XIII), ce qui autorisait une surveillance de leur viabilité de plusieurs heures supplémentaires par rapport à un blastocyste vitrifié à J6 et réchauffé le jour du

transfert. Cette différence de traitement n'a pas contribué à améliorer les résultats des taux de naissance par transfert des J5 comme le montre le tableau XIII.

Les embryons ayant un développement plus lent pourraient avoir une viabilité plus faible. Le tableau XXVIII montre un taux de lyse plus important après réchauffement ($p=0,0840$). Plusieurs auteurs expliquent la diminution du taux de naissance et l'augmentation du taux de lyse des J6 par une augmentation du nombre d'anomalies chromosomiques comparativement aux embryons qui se développent rapidement (Taylor et al. 2014)(Kort et al. 2015).

L'équipe de Taylor (Taylor et al. 2014) a étudié la différence de taux d'euploïdie des blastocystes J5 et des J6 après biopsie du trophoctoderme et leurs issues. Tous les transferts d'embryons étaient réalisés au sixième jour de l'administration de progestérone (50 mg/J; Actavis, USA). Le pourcentage d'embryon euploïde était de 55,8%(235/421) pour les J5 contre 44,6% (184/413) pour les J6 ($p= 0.0014$). Les taux de grossesse biochimique, de grossesse clinique et d'implantation n'étaient pas significativement différents entre les différents blastocystes euploïdes J5 ou J6 transférés. Cependant, cette diminution d'environ 10% en valeur absolue du nombre de blastocyste J6 euploïde ne permet pas d'expliquer totalement l'écart observé dans notre étude (tableau XIII).

Les faibles résultats des blastocystes vitrifiés à J6 pourraient également être dus à une mauvaise synchronie avec l'endomètre. Le processus d'implantation nécessite une synchronie entre un embryon sain et un endomètre fonctionnellement réceptif. Ceci peut expliquer les résultats plus encourageants observés en cycles congelés pour les blastocystes vitrifiés à J6 et transférés après une préparation endométriale optimale (Liebermann et Tucker 2006) (Shapiro B et al. 2013). Un endomètre moins avancé, donnerait plus de temps au blastocyste à développement lent (typiquement les J6 euploïdes) d'évoluer et de ne pas manquer la fenêtre implantatoire. L'équipe de Shapiro B, a montré qu'un blastocyste vitrifié à J6 et transféré dans un cycle de décongélation donnait plus de grossesse qu'un blastocyste de même qualité dans un cycle de transfert frais (Shapiro B et al. 2013). Dans cette étude le protocole de préparation endométriale du transfert congelé consistait en un traitement pendant 10 à 14 jours d'œstradiol per os suivi de l'ajout d'une injection quotidienne de progestérone (100mg). Dans une étude randomisée de 2007, les auteurs concluent que chez les femmes âgées de moins de 39 ans, les blastocystes décongelés et transférés au 6ème jour de l'administration de progestérone auraient un meilleur potentiel implantatoire qu'au 7ème jour de progestérone, mais les résultats n'atteignaient pas le seuil de significativité ($p=0.058$) (Ding, Rana, et Dmowski 2007).

Les concentrations endométriales de progestérone sont plus élevées lorsqu'elles sont administrées par voie intravaginale par rapport à la voie intra musculaire. Ceci peut entraîner la fermeture de la fenêtre implantatoire plus rapidement. Il a été suggéré de retarder l'administration de progestérone intra vaginale dans des cycles congelés afin de pallier à cette fermeture prématurée de la fenêtre implantatoire (Kaser et al. 2012). Une équipe a comparé les issues de grossesses après transfert de blastocystes effectué au 6^{ème} jour de progestérone par voie intravaginale (90 mg deux fois par jour) ou intramusculaire (50 mg une fois par jour) et n'a pas trouvé de différence significative (Shapiro D et al. 2014). Pour l'équipe de Richter les blastocystes vitrifiés à J5 ou J6 ont le même potentiel implantatoire après un transfert au 5^{ème} jour de l'injection de progestérone (Richter et al. 2006).

Au final, les résultats des études sur ce sujet sont controversés, les protocoles de prises en charges restent variables et du ressort de chaque centre. Dans ce contexte, l'analyse de la signature transcriptomique de la réceptivité endométriale (Endometrial Receptivity Array) présente un intérêt important dans la compréhension de la synchronie endomètre - embryon. Il permet de dater plus précisément la fenêtre implantatoire par rapport à l'analyse histologique selon les critères de Noyes (Díaz-Gimeno et al. 2013)(Ruiz-Alonso et al. 2013)(Mahajan 2015).

Des études randomisées contrôlées sont attendues pour évaluer la meilleure stratégie à adopter vis à vis de la cryopreservation et du transfert des blastocystes développés à J6.

E. La qualité morphologique du blastocyste

Nous avons montré qu'il y avait une corrélation entre le score cumulé du bouton embryonnaire et du trophoctoderme avant vitrification et le taux de naissance après transfert.

La valeur prédictive de la qualité morphologique selon la classification de Gardner après un transfert frais n'est plus à démontrer (Van den Abbeel et al. 2013)(Hill et al. 2013)(Balaban et al. 2011). Peu d'auteurs ont étudié l'influence que pouvait avoir la qualité morphologique du blastocyste avant congélation sur les taux de grossesse après transfert d'embryon vitrifié (N. Desai et Goldfarb 2005)(Ebner et al. 2009) (Zhang et al. 2014) (Ahlström et al. 2013) . Notre étude suggère qu'autant le bouton embryonnaire que le trophoctoderme sont à prendre en considération dans l'évaluation de la qualité morphologique. Il suffirait d'avoir l'un des deux grades noté A (sans grade C) pour que les chances de naissance soient augmentées significativement. Le grade du bouton

embryonnaire serait l'élément le plus important. Les grades AB ont des taux de naissance plus élevés qu'un grade BA, et un grade cumulé AA est équivalent statistiquement à un grade AB (tableau XX). Dans une étude rétrospective portant sur 172 cycles de décongélation, il est montré que le paramètre le plus important est le grade du bouton embryonnaire (Zhang et al. 2014).

Les taux de naissance étaient indépendants du degré d'expansion du blastocyste de B1 à B4, dans notre étude. Nous avons constaté que les blastocystes au stade B5 (en cours d'éclosion) ou au stade B6 (éclos) étaient associés à des taux de naissance moins importants lorsqu'ils étaient vitrifiés à ces stades (tableau XIV). Ceci est en contradiction avec ce qui est trouvé lors d'un cycle frais. Les blastocystes expansés (B4), en cours d'éclosion (B5) ou éclos (B6) sont au contraire des facteurs prédictifs positifs de naissance vivante après un transfert frais (Van den Abbeel et al. 2013)(Balaban et al. 2011).

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que ces blastocystes ont une cavité blastocœlique plus importante et contiennent une quantité de liquide plus importante. Ainsi, ils forment plus de cristaux de glace lors du refroidissement responsables de leurs lyses(Zech et al. 2005). Une étude prospective a montré que les embryons non expansés (morula, B1, B2 B3) avaient des taux de survies plus importants que les blastocystes expansés ou éclos indépendamment de leur jour de vitrification (Ebner et al. 2009). Il est montré à plusieurs reprises que les taux de survie des blastocystes expansés ou éclos pourraient être améliorés par une réduction artificielle de la cavité blastocœlique (Zech et al. 2005)(Vanderzwalmen et al. 2003). L'équipe de Ahlström, dans une étude rétrospective a montré que les blastocystes expansés avant leur vitrification donnaient des taux de naissance plus importants. Dans cette étude, il était pratiqué une réduction artificielle de la cavité blastocœlique (Ahlström et al. 2013).

Nous n'avons pas constaté de taux de lyse plus important pour ces blastocystes par notre technique de vitrification (tableau XV). Ce taux de naissance plus faible serait lié dans notre étude au jour de vitrification. La plupart (76.5%) étaient vitrifiés à J6 (tableau XVI) et les taux de naissance étaient statistiquement équivalents lorsque l'on comparait les embryons B5 ou B6 vitrifiés à J5 avec les autres embryons vitrifiés à J5.

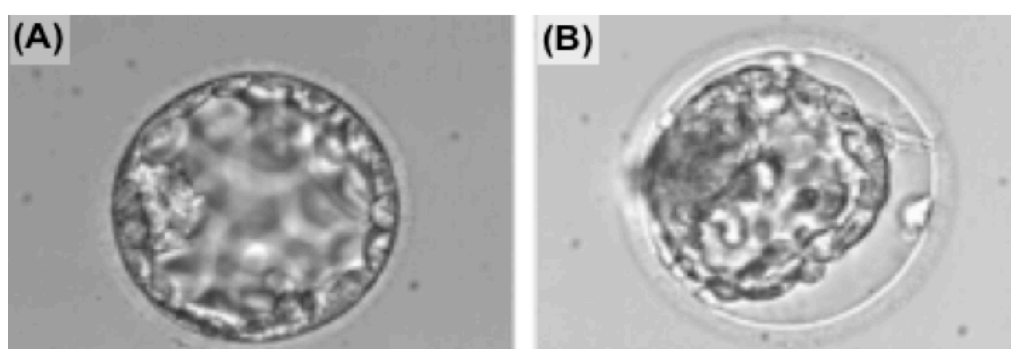
L'évaluation de la morphologie embryonnaire au stade blastocyste est faiblement corrélée aux anomalies chromosomiques. Elle ne permet pas une sélection efficace contre l'aneuploïdie, dont l'incidence augmente avec l'âge de la femme (Balaban et al. 2011). Ces anomalies chromosomiques qui persistent pour environ 50% des blastocystes peuvent être identifiées par le screening préimplantatoire(Balaban et al. 2011)(Taylor et al. 2014)(Kort

et al. 2015). Une stratégie basée sur la sélection des blastocystes uniquement selon leur morphologie entraîne un risque de perte embryonnaire et par conséquent une perte de chance sur l'ensemble des tentatives. Un compromis doit être trouvé afin de maintenir des taux corrects de naissance. Il est nécessaire de réduire le nombre de blastocystes cryoconservés qu'à ceux dont les possibilités de succès sont statistiquement significatives.

- **Le caractère expansé /rétracté après réchauffement**

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre un caractère expansé et une augmentation des taux de naissance. Nous avons observé des taux de naissance diminués lorsque le blastocyste était expansé après réchauffement sans que les résultats ne soient significatifs (tableau XIX) (tableau XXIX). Dans notre étude, la morphologie du blastocyste était notée directement après réchauffement. Uniquement les caractères ré-expansés, rétractés ou lysés étaient évalués. Pourtant, certains auteurs indiquent que le degré de ré-expansion (figure 12) et une ré-expansion rapide du blastocyste évalué immédiatement (Desai et Goldfarb 2005) ou dans les 2 à 4 heures après réchauffement sont des facteurs prédictifs de naissance après transfert (Ahlström et al. 2013)(Ebner et al. 2009).

Cette question de la morphologie après réchauffement reste donc débattue. Une étude portant sur ce sujet notamment grâce au monitoring vidéo (time lapse) permettra de clarifier le sujet.



D'après Ahlström et al. 2013

Figure 12 : Degré d'expansion du blastocyste après réchauffement

(A) Blastocyste ré-expansé à 100% ; (B) Blastocyste ré-expansé à 60% ;

V. Conclusion

Notre étude montre qu'il existe trois facteurs prédictifs positifs de naissance vivante après transfert d'embryon congelé :

- Un blastocyste vitrifié au cinquième jour de son développement
- Une qualité morphologique du bouton embryonnaire et du trophoctoderme notée AA ou AB ou BA au moment de la vitrification.
- Un blastocyste issu d'un cycle de FIV sans transfert frais

Nous avons constaté que le transfert d'un blastocyste formé et congelé à J6 reste un frein à une issue favorable contrastant avec les données récentes de la littérature. L'hypothèse d'une préparation de l'endomètre moins optimale pour ces embryons à développement plus lent est à considérer. Sur ce point, il existe une possibilité d'améliorer nos résultats. La perspective d'une étude randomisée afin d'évaluer les protocoles de préparation endométriale et plus globalement l'étude de la synchronie embryon-endomètre sera d'un grand intérêt.

Nos résultats nous encouragent à évaluer plus précisément la qualité morphologique du trophoctoderme et du bouton embryonnaire avant la vitrification. Cette évaluation morphologique est utile notamment pour la sélection des embryons à vitrifier et à transférer. La sélection des embryons pourra à l'avenir être améliorée par des techniques nouvelles de « screening » des embryons euploïdes. Cependant, elles nécessitent une biopsie du trophoctoderme et restent encore couteuse. A l'heure actuelle, ces tests génétiques préimplantatoires dans cette indication ne sont pas autorisés en France.

On retiendra enfin que les patientes dont l'indication d'un transfert différé est décidé, doivent être rassurées du fait d'un pronostic plus favorable. Cependant le transfert différé à titre systématique proposé par quelques auteurs n'a pas été étudié dans cette étude. Il sera intéressant de comparer à l'avenir les taux de naissances cumulés par cycle de FIV de cette stratégie par rapport à celle avec transfert frais.

Bibliographie

- AbdelHafez FF, Desai N, Abou-Setta AM, Falcone T, et Goldfarb J. 2010. « Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis ». *Reproductive BioMedicine Online* 20 (2): 209-22. doi:10.1016/j.rbmo.2009.11.013.
- Ahlström A, Westin C, Wikland M, et Hardarson T. 2013. « Prediction of Live Birth in Frozen–thawed Single Blastocyst Transfer Cycles by Pre-Freeze and Post-Thaw Morphology ». *Human Reproduction* 28 (5): 1199-1209. doi:10.1093/humrep/det054.
- Balaban B, Brison D, Calderón G, Catt J, Conaghan J, Cowan L, Ebner T, et al. 2011. « The Istanbul Consensus Workshop on Embryo Assessment: Proceedings of an Expert Meeting ». *Human Reproduction* 26 (6): 1270-83. doi:10.1093/humrep/der037.
- Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, et Lutze-Wallace C. 2000. « Viral Contamination of Embryos Cryopreserved in Liquid Nitrogen ». *Cryobiology* 40 (2): 110-16. doi:10.1006/cryo.1999.2227.
- Blockeel C, Drakopoulos P, Santos-Ribeiro S, Polyzos NP, et Tournaye H. 2016. « A Fresh Look at the Freeze-All Protocol: A SWOT Analysis ». *Human Reproduction* 31 (3): 491-97. doi:10.1093/humrep/dev339.
- Boothroyd C, Karia S, Andreadis N, Rombauts L, Johnson N, Chapman M, et Australasian CREI Consensus Expert Panel on Trial evidence (ACCEPT) group. 2015. « Consensus Statement on Prevention and Detection of Ovarian Hyperstimulation Syndrome ». *The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology* 55 (6): 523-34. doi:10.1111/ajo.12406.
- Bosch E, Labarta E, Kolibianakis E, Rosen M, et Meldrum D. 2016. « Regimen of ovarian stimulation affects oocyte and therefore embryo quality ». *Fertility and Sterility* 105 (3): 560-70. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.01.022.
- De los Santos MJ, Arroyo G, Busquet A, Calderón G, Cuadros J, Hurtado de Mendoza MV, Moragas M, et al. 2014. « A multicenter prospective study to assess the effect of early cleavage on embryo quality, implantation, and live-birth rate ». *Fertility and Sterility* 101 (4): 981-87. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.12.043.
- Demko ZP, Simon AL, McCoy RC, Petrov DA, et Rabinowitz M. 2016. « Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-

- chromosome single-nucleotide polymorphism–based preimplantation genetic screening ». *Fertility and Sterility*. Consulté le mars 16. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.01.025.
- Desai N, et Goldfarb J. 2005. « Examination of frozen cycles with replacement of a single thawed blastocyst ». *Reproductive BioMedicine Online* 11 (3): 349-54. doi:10.1016/S1472-6483(10)60843-7.
- Desai NN, Goldberg JM, Austin C, et Falcone T. 2013. « The new Rapid-i carrier is an effective system for human embryo vitrification at both the blastocyst and cleavage stage ». *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 11 (mai): 41. doi:10.1186/1477-7827-11-41.
- Dessolle L, Fréour T, Ravel C, Jean M, Colombel A, Daraï E, et Barrière P. 2011. « Predictive Factors of Healthy Term Birth after Single Blastocyst Transfer ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 26 (5): 1220-26. doi:10.1093/humrep/der039.
- Díaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Bosch N, Martínez-Conejero JA, Alamá P, Garrido N, Pellicer A, et Simón C. 2013. « The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity ». *Fertility and Sterility* 99 (2): 508-17. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.09.046.
- Ding J, Rana N, et Dmowski WP. 2007. « Length of Progesterone Treatment before Transfer and Implantation Rates of Frozen-Thawed Blastocysts ». *Fertility and Sterility* 88 (septembre): S330-31. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.07.1106.
- Ebner T, Vanderzwalmen P, Shebl O, Urdl W, Moser M, Zech NH, et Tews G. 2009. « Morphology of vitrified/warmed day-5 embryos predicts rates of implantation, pregnancy and live birth ». *Reproductive BioMedicine Online* 19 (1): 72-78. doi:10.1016/S1472-6483(10)60049-1.
- Edwards RG, Steptoe PC, et Purdy JM. 1980. « Establishing Full-Term Human Pregnancies Using Cleaving Embryos Grown in Vitro* ». *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 87 (9): 737-56. doi:10.1111/j.1471-0528.1980.tb04610.x.
- Elgindy E, et Elsedek MS. 2012. « Day 5 Expanded Blastocysts Transferred on Same Day Have Comparable Outcome to Those Left for More Extended Culture and Transferred on Day 6 ». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 29 (10): 1111-15. doi:10.1007/s10815-012-9837-4.

- Gardner DK, Lane M, et Schoolcraft WB. 2002. « Physiology and culture of the human blastocyst ». *Journal of Reproductive Immunology* 55 (1–2): 85–100. doi:10.1016/S0165-0378(01)00136-X.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, et Schoolcraft WB. 2000. « Blastocyst Score Affects Implantation and Pregnancy Outcome: Towards a Single Blastocyst Transfer ». *Fertility and Sterility* 73 (6): 1155–58. doi:10.1016/S0015-0282(00)00518-5.
- Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, et Schoolcraft WB. 2004. « Single Blastocyst Transfer: A Prospective Randomized Trial ». *Fertility and Sterility* 81 (3): 551–55. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.07.023.
- Ghobar T, et Vanderkerchove P. 2008. « Cycle Regimens for Frozen-Thawed Embryo Transfer ». In *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd. <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1002/14651858.CD003414.pub2/abstract>.
- Giorgetti C, Chabert-Orsini V, Barry B, Chinchole JM, Franquebalme JP, Hans E, Glowaczower E, et al. 2006. « Transfert électif d'un seul embryon : une option justifiée pour une population de patientes sélectionnées ». *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 34 (4): 317–22. doi:10.1016/j.gyobfe.2006.02.009.
- Glujovsky D, Blake D, Bardach A, et Farquhar C. 2012. « Cleavage Stage versus Blastocyst Stage Embryo Transfer in Assisted Reproductive Technology ». In *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd. <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1002/14651858.CD002118.pub4/abstract>.
- Graham J, Han T, Porter R, Levy M, Stillman R, et Tucker MJ. 2000. « Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture ». *Fertility and Sterility* 74 (3): 495–97. doi:10.1016/S0015-0282(00)00689-0.
- Griesinger G, Diedrich K, Devroey P, et E. M. Kolibianakis. 2006. « GnRH Agonist for Triggering Final Oocyte Maturation in the GnRH Antagonist Ovarian Hyperstimulation Protocol: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Human Reproduction Update* 12 (2): 159–68. doi:10.1093/humupd/dmi045.
- Griesinger G, Kolibianakis EM, Papanikolaou EG, Diedrich K, Van Steirteghem A, Devroey P, Ejdrup Bredkjaer H, et Humaidan P. 2007. « Triggering of final oocyte maturation with gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic

- gonadotropin. Live birth after frozen-thawed embryo replacement cycles ». *Fertility and Sterility* 88 (3): 616-21. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.12.006.
- Guerif F, Frapsauce C, Chavez C, Cadoret V, et Royere D. 2011. « Treating Women under 36 Years Old without Top-Quality Embryos on Day 2: A Prospective Study Comparing Double Embryo Transfer with Single Blastocyst Transfer ». *Human Reproduction* 26 (4): 775-81. doi:10.1093/humrep/der020.
- Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, et Royere D. 2007. « Limited Value of Morphological Assessment at Days 1 and 2 to Predict Blastocyst Development Potential: A Prospective Study Based on 4042 Embryos ». *Human Reproduction* 22 (7): 1973-81. doi:10.1093/humrep/dem100.
- Heal MW, Patounakis G, Connell MT, Devine K, DeCherney AH, Levy MJ, et Hill MJ. 2015. « Does a Frozen Embryo Transfer Ameliorate the Effect of Elevated Progesterone Seen in Fresh Transfer Cycles? » *Fertility and Sterility*, octobre. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.09.015.
- Hill MJ, Richter KS, Heitmann RJ, Graham JR, Tucker MJ, DeCherney AH, Browne PE, et Levens ED. 2013. « Trophectoderm Grade Predicts Outcomes of Single-Blastocyst Transfers ». *Fertility and Sterility* 99 (5): 1283-89.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.12.003.
- Hill MJ, Royster GD 4th, Healy MW, Richter KS, Levy G, DeCherney AH, Levens ED, Suthar G, Widra E, et Levy MJ. 2015. « Are good patient and embryo characteristics protective against the negative effect of elevated progesterone level on the day of oocyte maturation? » *Fertility and Sterility* 103 (6): 1477-84.e5. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.02.038.
- Huang J, Li R, Lian Y, Chen L, Shi X, Qiao J, et Liu P. 2015. « Vitrified/warmed single blastocyst transfer in preimplantation genetic diagnosis/preimplantation genetic screening cycles ». *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8 (11): 21605-10.
- Humaidan P, Bredkjær HE, Bungum L, Bungum M, Grøndahl ML, Westergaard L, et Andersen CY. 2005. « GnRH Agonist (buserelin) or hCG for Ovulation Induction in GnRH Antagonist IVF/ICSI Cycles: A Prospective Randomized Study ». *Human Reproduction* 20 (5): 1213-20. doi:10.1093/humrep/deh765.
- Ishihara O, Adamson GD, Dyer S, de Mouzon J, Nygren KG, Sullivan EA, Zegers-Hochschild F, et Mansour R. 2015. « International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies: World Report on Assisted Reproductive

- Technologies, 2007 ». *Fertility and Sterility* 103 (2): 402-13.e11. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.11.004.
- Karlström PO, et Bergh C. 2007. « Reducing the Number of Embryos Transferred in Sweden-Impact on Delivery and Multiple Birth Rates ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 22 (8): 2202-7. doi:10.1093/humrep/dem120.
- Kaser DJ, Ginsburg ES, Missmer SA, Correia KF, et Racowsky C. 2012. « Intramuscular progesterone versus 8% Crinone vaginal gel for luteal phase support for day 3 cryopreserved embryo transfer ». *Fertility and Sterility* 98 (6): 1464-69. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.08.007.
- Kort JD, Lathi RB, Brookfield K, Baker VL, Zhao Q, et Behr BR. 2015. « Aneuploidy Rates and Blastocyst Formation after Biopsy of Morulae and Early Blastocysts on Day 5 ». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 32 (6): 925-30. doi:10.1007/s10815-015-0475-5.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, et Kato O. 2005. « Comparison of Open and Closed Methods for Vitricification of Human Embryos and the Elimination of Potential Contamination ». *Reproductive Biomedicine Online* 11 (5): 608-14.
- Lamazou F, Legouez A, Letouzey V, Grynberg M, Deffieux X, Trichot C, Fernandez H, et Frydman R. 2011. « [Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology, risk factors, prevention, diagnosis and treatment] ». *Journal De Gynécologie, Obstétrique Et Biologie De La Reproduction* 40 (7): 593-611. doi:10.1016/j.jgyn.2011.06.008.
- Lane M, et Gardner DK 2007. « Embryo culture medium: which is the best? » *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, Controversies in Assisted Reproductive Technologies, 21 (1): 83-100. doi:10.1016/j.bpobgyn.2006.09.009.
- Levens ED, Whitcomb BW, Hennessy S, James AB, Yauger BJ, et Larsen FW. 2008. « Blastocyst development rate impacts outcome in cryopreserved blastocyst transfer cycles ». *Fertility and Sterility* 90 (6): 2138-43. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.10.029.
- Liebermann J, et Tucker MJ. 2006. « Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application ». *Fertility and Sterility* 86 (1): 20-26. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.01.029.
- Loutradi, Kalliopi E., Efstratios M. Kolibianakis, Christos A. Venetis, Evangelos G. Papanikolaou, George Pados, Ioannis Bontis, et Basil C. Tarlatzis. 2008.

- « Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis ». *Fertility and Sterility* 90 (1): 186-93. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.06.010.
- Luke B, Brown MB, Wantman E, Lederman A, Gibbons W, Schattman GL, Lobo RA, Leach RE, et Stern JE. 2012. « Cumulative Birth Rates with Linked Assisted Reproductive Technology Cycles ». *New England Journal of Medicine* 366 (26): 2483-91. doi:10.1056/NEJMoa1110238.
- Magli MC, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Korman I, et Trownson AO. 2000. « Chromosome Mosaicism in Day 3 Aneuploid Embryos That Develop to Morphologically Normal Blastocysts in Vitro ». *Human Reproduction* 15 (8): 1781-86. doi:10.1093/humrep/15.8.1781.
- Mahajan N. 2015. « Endometrial receptivity array: Clinical application ». *Journal of Human Reproductive Sciences* 8 (3): 121-29. doi:10.4103/0974-1208.165153.
- Maheshwari A, Pandey S, Shetty A, Hamilton M, et Bhattacharya S. 2012. « Obstetric and Perinatal Outcomes in Singleton Pregnancies Resulting from the Transfer of Frozen Thawed versus Fresh Embryos Generated through in Vitro Fertilization Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Fertility and Sterility* 98 (2): 368-77.e9. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.05.019.
- McLernon DJ, Harrild K, Bergh C, Davies MJ, de Neubourg D, Dumoulin JC, Gerris J, et al. 2010. « Clinical Effectiveness of Elective Single versus Double Embryo Transfer: Meta-Analysis of Individual Patient Data from Randomised Trials ». *BMJ* 341 (décembre): c6945. doi:10.1136/bmj.c6945.
- Panagiotidis Y, Vanderzwalmen P, Prapas Y, Kasapi E, Goudakou M, Papatheodorou A, Passadaki T, et al. 2013. « Open versus closed vitrification of blastocysts from an oocyte-donation programme: a prospective randomized study ». *Reproductive BioMedicine Online* 26 (5): 470-76. doi:10.1016/j.rbmo.2013.01.016.
- Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, et Devroey P. 2006. « In Vitro Fertilization with Single Blastocyst-Stage versus Single Cleavage-Stage Embryos ». *New England Journal of Medicine* 354 (11): 1139-46. doi:10.1056/NEJMoa053524.
- Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, Venetis CA, Fatemi H, Tarlatzis B, et Devroey P. 2008. « Live Birth Rates after Transfer of Equal Number of Blastocysts or Cleavage-Stage Embryos in IVF. A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Human Reproduction* 23 (1): 91-99. doi:10.1093/humrep/dem339.

- Richter KS, Shipley SK, McVearry I, Tucker MJ, et Widra EA. 2006. « Cryopreserved embryo transfers suggest that endometrial receptivity may contribute to reduced success rates of later developing embryos ». *Fertility and Sterility* 86 (4): 862-66. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.02.114.
- Roque M. 2015. « Freeze-all policy: is it time for that? » *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 32 (2): 171-76. doi:10.1007/s10815-014-0391-0.
- Roque M, Lattes K, Serra S, Solà S, Geber S, Carreras R, et Checa MA. 2013. « Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis ». *Fertility and Sterility* 99 (1): 156-62. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.09.003.
- Roque M, Valle M, Guimarães F, Sampaio M, et Geber S. 2015a. « Freeze-all policy: fresh vs. frozen-thawed embryo transfer ». *Fertility and Sterility* 103 (5): 1190-93. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.01.045.
- Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F, Carrera J, Vilella F, Pellicer A, et Simón C. 2013. « The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure ». *Fertility and Sterility* 100 (3): 818-24. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.05.004.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, et Hudson C. 2014a. « Clinical rationale for cryopreservation of entire embryo cohorts in lieu of fresh transfer ». *Fertility and Sterility* 102 (1): 3-9. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.04.018.
- . 2014b. « Freeze-All Can Be a Superior Therapy to Another Fresh Cycle in Patients with Prior Fresh Blastocyst Implantation Failure ». *Reproductive Biomedicine Online* 29 (3): 286-90. doi:10.1016/j.rbmo.2014.04.009.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, et Thomas S. 2011. « Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders ». *Fertility and Sterility* 96 (2): 344-48. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.05.050.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, et Ross R. 2008. « Contrasting Patterns in in Vitro Fertilization Pregnancy Rates among Fresh Autologous, Fresh Oocyte Donor, and Cryopreserved Cycles with the Use of Day 5 or Day 6

- Blastocysts May Reflect Differences in Embryo-Endometrium Synchrony ». *Fertility and Sterility* 89 (1): 20-26. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.08.092.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, et Ross R, et Morris S. 2005. « Effects of the ovulatory serum concentration of human chorionic gonadotropin on the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome and success rates for in vitro fertilization ». *Fertility and Sterility* 84 (1): 93-98. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.12.053.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Restrepo H, Garner FC, Aguirre M, et Hudson C. 2013. « Matched-cohort comparison of single-embryo transfers in fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles ». *Fertility and Sterility* 99 (2): 389-92. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.09.044.
- Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, et Daneshmand ST. 2001. « A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers ». *Fertility and Sterility* 75 (6): 1126-30. doi:10.1016/S0015-0282(01)01771-X.
- Shapiro DB, Pappadakis JA, Ellsworth NM, Hait HI, et Nagy ZP. 2014. « Progesterone Replacement with Vaginal Gel versus I.m. Injection: Cycle and Pregnancy Outcomes in IVF Patients Receiving Vitrified Blastocysts ». *Human Reproduction* 29 (8): 1706-11. doi:10.1093/humrep/deu121.
- Shoukir Y, Chardonens D, Campana A, Bischof P, et Sakkas D. 1998. « The Rate of Development and Time of Transfer Play Different Roles in Influencing the Viability of Human Blastocysts. » *Human Reproduction* 13 (3): 676-81. doi:10.1093/humrep/13.3.676.
- Taylor TH, Patrick JL, Gitlin SA, Wilson JM, Crain JL, et Griffin DK. 2014. « Comparison of aneuploidy, pregnancy and live birth rates between day 5 and day 6 blastocysts ». *Reproductive BioMedicine Online* 29 (3): 305-10. doi:10.1016/j.rbmo.2014.06.001.
- Trounson A, et Mohr L. 1983. « Human Pregnancy Following Cryopreservation, Thawing and Transfer of an Eight-Cell Embryo ». *Nature* 305 (5936): 707-9. doi:10.1038/305707a0.
- Van den Abbeel E, Balaban B, Ziebe S, Lundin K, Cuesta MJ, Klein BM, Helmgaard L, et Arce JC. 2013. « Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer ». *Reproductive BioMedicine Online* 27 (4): 353-61. doi:10.1016/j.rbmo.2013.07.006.

- Van der Linden M, Buckingham K, Farquhar C, Kremer JA, et Metwally M. 2015. « Luteal Phase Support for Assisted Reproduction Cycles ». In *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd. <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1002/14651858.CD009154.pub3/abstract>.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, Bollen N, van Roosendaal E, Vandervorst M, Schoysman R, et Zech N. 2003. « Vitriification of Human Blastocysts with the Hemi-Straw Carrier: Application of Assisted Hatching after Thawing ». *Human Reproduction* 18 (7): 1504-11. doi:10.1093/humrep/deg298.
- Vanderzwalmen P, Zech N, Greindl AJ, Ectors F, et Lejeune B. 2006. « Cryopréservation des embryons humains par vitrification ». *Gynécologie Obstétrique & Fertilité, Onzièmes Journées nationales de la FFER (Paris, 11-13 octobre 2006)*, 34 (9): 760-69. doi:10.1016/j.gyobfe.2006.07.010.
- Wennerholm UB., Söderström-Anttila V, Bergh C, Aittomäki K, Hazekamp J, Nygren KG, Selbing A, et Loft A. 2009. « Children Born after Cryopreservation of Embryos or Oocytes: A Systematic Review of Outcome Data ». *Human Reproduction* 24 (9): 2158-72. doi:10.1093/humrep/dep125.
- « WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen ». 2010 *WHO*.<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>.
- Xu B, Li Z, Zhang H, Jin L, Li Y, Ai J, et Zhu G. 2012. « Serum Progesterone Level Effects on the Outcome of in Vitro Fertilization in Patients with Different Ovarian Response: An Analysis of More than 10,000 Cycles ». *Fertility and Sterility* 97 (6): 1321-27.e4. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.03.014.
- Youssef MA, F. M., Van der Veen F, Al-Inany HG, Mochtar MH, Griesinger G, Nagi Mohesen M, Aboulfoutouh I, et van Wely M. 2014. « Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist versus HCG for Oocyte Triggering in Antagonist-Assisted Reproductive Technology ». *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 10: CD008046. doi:10.1002/14651858.CD008046.pub4.
- Zech NH, Lejeune B, Zech H, et Vanderzwalmen P. 2005. « Vitriification of hatching and hatched human blastocysts: effect of an opening in the zona pellucida before vitrification ». *Reproductive BioMedicine Online* 11 (3): 355-61. doi:10.1016/S1472-6483(10)60844-9.

- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S, International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology, et World Health Organization. 2009. « International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary of ART Terminology, 2009 ». *Fertility and Sterility* 92 (5): 1520-24. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.09.009.
- Zhang H, Zhou Y, Li Y, Zheng Y, Xiao S, Wu Y, Wang H, et Huang X. 2014. « Prediction of clinical pregnancy in vitrified-warmed single blastocyst transfer cycles by pre-freeze morphology ». *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 12 (8): 567-72.
- Zhu L, Li Y, et Xu A. 2012. « Influence of Controlled Ovarian Hyperstimulation on Uterine Peristalsis in Infertile Women ». *Human Reproduction* 27 (9): 2684-89. doi:10.1093/humrep/des257.

Nom: AFOLAYAN

Prénom: Olakunlé

Titre du Mémoire/Thèse : Facteurs prédictifs de naissance vivante après transfert d'embryon vitrifié au stade blastocyste

Résumé du Mémoire/Thèse :

Afin de multiplier les chances de naissance vivante après fécondation in vitro, les embryons surnuméraires peuvent être vitrifiés au stade blastocyste. Le transfert de ces blastocystes se fait lors d'un prochain cycle programmé. L'objectif de ce travail a été de déterminer les facteurs prédictifs de naissance après ce transfert.

Nous avons mené une étude rétrospective, monocentrique portant sur 775 cycles de décongélation.

Les résultats de l'analyse multivariée ont montré que les probabilités de naissance vivante étaient plus élevées lorsque :

- Le blastocyste était issu d'un cycle de FIV sans transfert frais
- Le blastocyste a été vitrifié au cinquième jour de son développement
- La qualité morphologique du bouton embryonnaire et du trophoctoderme était notée AA ou AB ou BA au moment de la vitrification.

Cette étude permettra d'améliorer la prise en charge des couples bénéficiant d'une AMP et les résultats de notre centre.

MOTS-CLES :

Fécondation in vitro

Blastocyste

Vitrification

Transfert différé

Fenêtre implantatoire