UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNÉE 2017 **N° 64**

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

Le 25 septembre 2017

Par Jean-Maxime GIRARD

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Evaluation de l'intérêt prédictif du KID Score™ Day 3 et du KID Score™ Day 5 en fécondation in vitro

---

Président :	**Madame le Professeur Virginie FERRE**
Directeur de thèse :	**Monsieur le Professeur Thomas FREOUR**
Membres du jury :	**Monsieur le Professeur Paul BARRIERE** **Madame le Professeur Célia RAVEL** **Madame le Docteur Sophie MIRALLIE**

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier

Madame le Professeur Virginie FERRE

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter avec enthousiasme de présider ce jury de thèse. Vos conseils et votre bienveillance m'ont été précieux depuis le début de mes études de pharmacie. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Thomas FREOUR

Pour avoir accepté de diriger ma thèse. Un grand merci pour ta pédagogie, ta bonne humeur et ta disponibilité sans faille lors de cette thèse et ces deux dernières années. J'ai appris énormément à tes côtés et je te dois beaucoup. Tu m'as conforté dans mon choix d'orientation lors de mon externat et je n'ai jamais regretté cette décision.
J'espère que l'on continuera à travailler ensemble ces prochaines années.

Monsieur le Professeur Paul BARRIERE

Pour me faire l'honneur d'apporter votre expérience à la critique de ce travail. Je vous prie de bien vouloir accepter ma respectueuse considération et l'expression de ma profonde gratitude.

Madame le Professeur Célia RAVEL

Pour me faire l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.
Je tenais également à vous exprimer ma profonde gratitude pour m'accueillir au sein de votre service.

Madame le Docteur Sophie MIRALLIE

Pour avoir accepté de juger mon travail. Tu as si gentiment et spontanément accepté de participer à ce jury. Tu m'as fait découvrir la BDR en 3ème année de pharmacie et l'idée de m'orienter dans ce domaine ne m'a jamais quitté. Un grand merci de m'avoir transmis ta passion pour ce domaine, toujours dans la bonne humeur, ainsi que pour toutes les connaissances que tu as pu m'apporter.

Arnaud, Jenna, Sophie

Pour ces moments passés avec vous. Inoubliables… Les lancers de peluches me manquent déjà ! De très belles amitiés sont nées, j'espère que ce n'est que le début. Et ne vous inquiétez pas, je n'oublierai jamais vos « faciales » !

Carole et l'ensemble de l'équipe du service de biologie et médecine de la reproduction

Pour votre bonne humeur sans faille et pour les connaissances que vous m'avez tous apportées. Ça a été un réel plaisir de travailler avec vous. Merci pour tout !

Max, Davy, Antoine, Claire & Claire

Pour toutes les années et soirées pharma passées avec vous, elles ont été géniales grâce à vous ! On repart quand en trek ? Je suis chaud !

Guillaume, Corentin, Paulo, Caro, Robin, Ronan, Olivier, Anne-Gaëlle et tous les internes que j'ai pu croiser

Pour tous ces moments de joies et de galères que nous avons partagés lors de ces 4 années d'internat.

Charlène, Aymeric, Alex, Chloé, LH, BenJ, Charles, Maëlle, Estelle…

Déjà plus de 10 ans d'amitié, ces années n'auraient pas été aussi belles sans vous !

Mes parents

Pour m'avoir accompagné et soutenu tout au long de ma vie. C'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui. Merci pour tout. J'espère être toujours digne de ce que vous m'avez appris et vous rendre fier.

Lionel et Agnès

Pour m'avoir toujours accepté et soutenu depuis le début. Vous êtes ma deuxième famille. Mais maintenant il est trop tard, vous allez devoir me supporter trèèèèès longtemps !

Choupette

Pour toutes ces années durant lesquelles tu m'as soutenu sans faille. Pour ton amour, ta présence et tes petites aides et attentions multiples pendant ce travail de thèse. Sans toi, la vie ne serait pas aussi belle ! Ce n'est que le début d'une très belle histoire…

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS **7**

TABLE DES FIGURES **8**

TABLE DES TABLEAUX **9**

GENERALITES **10**

Introduction **10**

Techniques d'assistance médicale à la procréation **12**

Evaluation de la qualité embryonnaire **14**

Transfert monoembryonnaire **19**

Transfert au stade précoce ou au stade blastocyste **20**

Time Lapse (analyse morphocinétique du développement embryonnaire) **22**

Aneuploïdie et Time Lapse **26**

Algorithmes morphocinétiques prédictifs **27**

KID Score™ Day 3 et KID Score™ Day 5 ..... **28**

KID Score™ Day 3 28

KID Score™ Day 5 31

OBJECTIFS **33**

MATERIELS ET METHODES **34**

Critères de sélection **34**

Stratégie de prise en charge **36**

Annotation des embryons **37**

Taux d'implantation **39**

Méthodologie statistique **39**

RESULTATS **40**

Population observée **40**

KID Score™ Day 3 ..... **41**

Evaluation de l'intérêt prédictif du KID Score™ Day 3 sur la blastulation des embryons 41

Evaluation de l'intérêt prédictif du KID Score™ Day 3 sur l'implantation des embryons lors d'un transfert frais effectué au stade blastocyste 45

KID Score™ Day 5 ..... **46**

DISCUSSION **48**

Intérêt prédictif du KID Score™ Day 3 sur la blastulation des embryons **49**

Intérêt prédictif des KID Score™ Day 3 et Day 5 sur l'implantation des embryons ... **51**

Intérêt du Time Lapse et des modèles prédictifs **53**

CONCLUSION **59**

BIBLIOGRAPHIE **60**

ABREVIATIONS

A.M.P.	Assistance médicale à la procréation
D.E.T.	Double embryo transfer
D.P.I.	Diagnostic préimplantatoire
F.I.V.	Fécondation in vitro
F.S.H.	Follicule stimulating hormone
H.O.S.T.	Hypo-osmotic swelling test
I.C.S.I.	Intracytoplasmic sperm injection
I.I.U.	Insémination intra-utérine
I.M.C.	Indice de masse corporelle
I.N.S.E.E.	Institut national de la statistique et des études économiques
I.S.	Induction simple de l'ovulation
O.A.T.S.	Oligo-asthéno-tératospermie
P.G.S.	Preimplantation genetic screening
S.E.T.	Single embryo transfer
S.U.Z.I	Subzonal insemination

TABLE DES FIGURES

Figure I : Evolution de l'activité globale d'A.M.P. entre 2011 et 2014 11

Figure II : Part des enfants nés après A.M.P. en 2014 13

Figure III : Technote du KID Score™ Day 3, Vitrolife®.....28

Figure IV : Algorithme du KID Score™ Day 3 selon Petersen et *al.* 29

Figure V : Technote du KID Score™ Day 5, Vitrolife® 31

Figure VI : Critères de sélection des embryons pour les études des KID Score™ Day 3 et KID Score™ Day 5.....35

Figure VII : Jours d'application des algorithmes KID Score™ Day 3 et KID Score™ Day 5...36

Figure VIII : Classification de Gardner et Schoolcraft 38

Figue IX : Pourcentage de blastulation des embryons en fonction du KID Score™ Day 3 41

Figure X : Comparaison des pourcentages de blastocystes (TQ + GQ) en fonction du KID Score™ Day 3.....44

Figure XI : Pourcentage d'implantation des embryons en fonction du KID Score™ Day 3 45

Figure XII : Pourcentage d'implantation des embryons en fonction du KID Score™ Day 5 ...46

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Système de notation des embryons au stade précoce (Alpha/ESHRE) 15

Tableau II : Système de notation des embryons au stade blastocyste (Alpha/ESHRE) 16

Tableau III : Technote du KID Score™ Day 3, Vitrolife®.....30

Tableau IV : Technote du KID Score™ Day 5, Vitrolife® 32

Tableau V : Comparaison des pourcentages de blastulation obtenus au C.H.U. de Nantes et publiés par Petersen.....42

Tableau VI : Nombre et pourcentage de blastocystes transférables à J5 en fonction du KID Score™ Day 3.....43

GENERALITES

Introduction

L'infertilité est l'incapacité pour un couple de concevoir un enfant (1) au bout d'un à deux ans de rapports sexuels réguliers selon les définitions, et en l'absence de contraception. Cette problématique est retrouvée dans toutes les civilisations à travers les siècles. Les différentes techniques d'assistance médicale à la procréation (A.M.P.) ont été développées pour permettre à des couples infertiles d'avoir des enfants. Nous retrouvons trace de la première insémination artificielle intraconjugale en Écosse à la fin du XVIIIème siècle. La naissance de Louise Brown, premier « bébé éprouvette » au monde, le 25 juillet 1978 grâce aux travaux d'Edwards et Steptoe, marque l'aboutissement d'une longue recherche scientifique en médecine de la reproduction. En 1982, Amandine est le premier bébé français né après une fécondation in vitro (F.I.V.).

Initialement, l'A.M.P. était réservée aux couples présentant des paramètres spermatiques normaux ou subnormaux. Ces couples pouvaient alors bénéficier d'inséminations intra-utérines ou de F.I.V. selon les cas. Des recherches se sont ensuite concentrées sur de nouvelles techniques permettant de remédier à l'infertilité masculine sévère. Le premier essai a été de créer une brèche dans la zone pellucide des complexes cumulo-ovocytaires et de les inséminer. Néanmoins, l'ouverture de la zone pellucide entrainait un taux de polyspermie très important. La seconde approche a consisté à injecter des spermatozoïdes dans l'espace péri vitellin (technique S.U.Z.I. : subzonal insemination), permettant ainsi de réduire le taux de polyspermie. En 1992, l'équipe de Devroey et Palermo invente la technique de l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (I.C.S.I.) permettant ainsi la prise en charge des infertilités masculines sévères. Le premier bébé français conçu grâce à cette technique nait en 1994.

L'A.M.P. est destinée à répondre à la demande parentale d'un couple. L'A.M.P. s'entend des pratiques cliniques et biologiques permettant la conception in vitro, la conservation des gamètes, des tissus germinaux et des embryons, le transfert d'embryons et l'insémination artificielle (2). Elle a pour objet de remédier à l'infertilité dont le caractère pathologique a été médicalement diagnostiqué ou d'éviter la transmission à l'enfant ou à un membre du couple d'une maladie d'une particulière gravité (2).

L'activité d'A.M.P. est importante et croit régulièrement en France (figure I), pays leader en Europe pour le nombre de tentatives. En 2014, selon l'I.N.S.E.E., 818 565 nouveau-nés ont vu le jour en France. Les enfants conçus après A.M.P. représentent 3,1 % des enfants de la population générale, soit 25 208 enfants (3). Ce taux augmente régulièrement (2,7 % en 2010, 2,8 % en 2011, 2,9 % en 2012 et 2013, 3,1 % en 2014). Parmi ces enfants conçus après A.M.P., 1 372 enfants, soit 5,4 %, sont nés suite à un don de gamète.

	2011	2012	2013	2014
Nombre de centres				
Nombre de laboratoires d'AMP**	92	96	97	93**
Nombre de centres clinico-biologiques**	104	103	104	101**
Nombre total d'inséminations artificielles	**59001**	**58478**	**57352**	**56468**
Inséminations intra-utérines intraconjugales	54772	54390	53555	52731
Inséminations intra-utérines avec sperme de donneur	4004	3870	3677	3618
Inséminations intra-cervicales avec sperme de donneur	225	218	120	119
Nombre total de tentatives réalisées en fécondation in vitro total (FIV hors ICSI, ICSI, TEC)	**82296**	**84140**	**85419**	**87310**
Selon l'origine des gamètes et des embryons (quelle que soit la technique de FIV)				
Intraconjugal	79567	81304	82474	84310
Don de spermatozoïdes	1529	1641	1602	1613
Accueil d'embryons	83	135	199	141
Don d'ovocytes	1117	1060	1144	1246
Selon les techniques (quelle que soit l'origine des gamètes et des embryons)				
FIV hors ICSI	21929	21478	21590	20717
ICSI	39816	40582	40774	41177
TEC	20551	22080	23055	25416
Nombre total de tentatives*	**141297**	**142618**	**142771**	**143778**

Figure I : Evolution de l'activité globale d'A.M.P. entre 2011 et 2014.

Source : Agence de la Biomédecine.

Techniques d'assistance médicale à la procréation

Différentes prises en charge existent, expliquées succinctement ci-dessous :

- L'induction simple de l'ovulation (I.S.) avec rapports programmés est indiquée pour les femmes présentant une dysovulation ou une anovulation. Cette technique ne fait cependant pas partie des actes réglementés d'A.M.P.

- L'insémination Intra-Utérine (I.I.U.) est indiquée dans les troubles de l'éjaculation, les troubles sexologiques et les anomalies cervicales.

- La F.I.V. est une technique indiquée pour les infertilités féminines, en l'absence de facteur masculin, comme par exemple des altérations tubaires, de l'endométriose ou des adhérences pelviennes. Des échecs d'I.S. ou d'I.I.U. peuvent également être des indications de recours à la F.I.V.

- L'I.C.S.I. est une technique indiquée dans les causes d'infertilité mixte ou masculine pure : oligo-asthéno-tératospermie (O.A.T.S.), faible rendement du test de migration-survie, azoospermie avec prélèvement chirurgical de spermatozoïdes…

Dans les deux cas (F.I.V. ou I.C.S.I.), des injections de F.S.H. à des doses supra physiologiques permettent un recrutement multifolliculaire. Après recueil par ponction trans-vaginale écho-guidée, chaque complexe cumulo-ovocytaire est lavé puis inséminé avec une quantité définie de spermatozoïdes (F.I.V.) ou microinjecté avec un seul spermatozoïde (I.C.S.I.). Après fécondation, les embryons sont cultivés au laboratoire pendant 2 à 6 jours avant d'être transférés ou vitrifiés.

La part d'enfants nés après A.M.P. en 2014 selon les techniques est représentée sur la figure II.

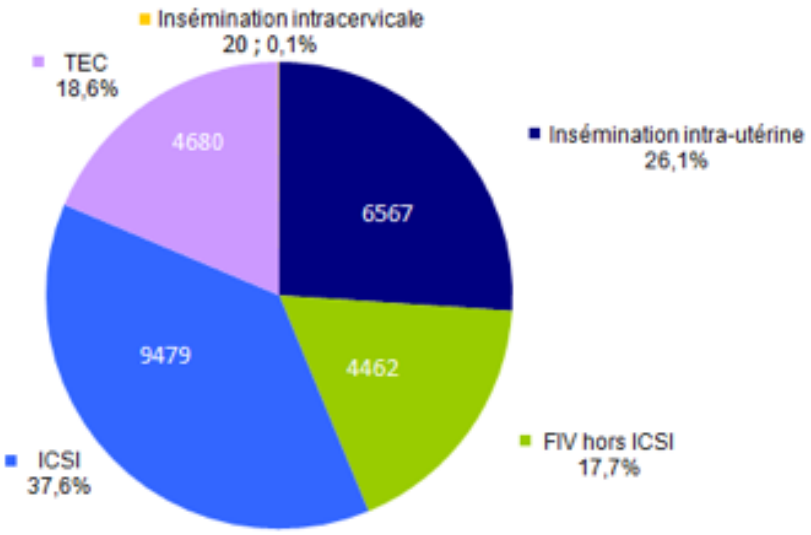

Figure II : Part des enfants nés après A.M.P. en 2014 selon les techniques d'A.M.P. quelle que soit l'origine des gamètes et des embryons. Source : Agence de la Biomédecine.

Evaluation de la qualité embryonnaire

Le biologiste de la reproduction est responsable du choix de l'embryon à transférer et doit donc s'appuyer sur des critères de sélection les plus robustes possibles. L'un des principaux objectifs est d'identifier quel embryon, dans une cohorte, possède le meilleur potentiel d'implantation afin de pourvoir le transférer, et quels embryons sont à conserver (vitrification) ou à écarter.

Depuis le début de la F.I.V., la sélection des embryons est principalement basée sur des critères morphologiques. Le biologiste de la reproduction observe régulièrement les différents embryons d'une cohorte au microscope et prend les décisions biologiques appropriées en fonction de ces observations ponctuelles.

Les embryons sont observés dès le premier jour de développement pour étudier l'apparition des deux pronuclei et un éventuel clivage précoce. Ils sont ensuite observés lors du deuxième et troisième jour de développement pour évaluer le nombre de cellules, leur symétrie et le pourcentage de fragmentation. La compaction cellulaire s'observe normalement au $4^{ème}$ jour de développement et le stade blastocyste est généralement observé au $5^{ème}$ jour de développement. Une évaluation de l'expansion du blastocyste, de sa masse cellulaire interne et de son trophectoderme est ainsi réalisée par le biologiste de la reproduction.

Le nombre d'observations des embryons au laboratoire doit cependant rester limité. Bien que les incubateurs actuellement disponibles fournissent des conditions de culture relativement stables, les ouvertures répétées des portes pour sortir les embryons, afin de pouvoir les observer, et pour les réinsérer provoquent des variations importantes des conditions de culture (température, pH, concentration en CO_2 et en oxygène, exposition à la lumière…) qui sont défavorables au bon développement embryonnaire. En fonction de l'incubateur utilisé et de la fréquence d'ouverture de la porte, le temps nécessaire pour revenir à un environnement stable

et optimal pour la culture embryonnaire peut être plus ou moins long et prendre jusqu'à plusieurs dizaines de minutes.

Différents systèmes de notation ont été créés afin de classifier les embryons aux différents stades de développement (4) (5). En 2011 un consensus international a été établi par un groupe d'experts recensant les données nécessaires à la description précise du développement embryonnaire (6) ; pour les stades embryonnaires précoces, un score est attribué à l'embryon en respectant l'ordre suivant : nombre de cellules, grade de l'embryon et justification du grade attribué (tableau I). Par exemple : 4 cellules, grade 2, fragmentation.

Grade	Rating	Description
1	Good	• <10% fragmentation • Stage-specific cell size • No multinucleation
2	Fair	• 10–25% fragmentation • Stage-specific cell size for majority of cells • No evidence of multinucleation
3	Poor	• Severe fragmentation (>25%) • Cell size not stage specific • Evidence of multinucleation

Tableau I : Système de notation des embryons au stade précoce (Alpha/ESHRE)

Pour le stade blastocyste, le score attribué respecte l'ordre suivant : stade de développement du blastocyste, évaluation de la masse cellulaire interne et évaluation du trophectoderme (tableau II). Par exemple, un blastocyste B4AB selon la classification de Gardner et *al*. (4) sera noté 312.

	Grade	Rating	Description
Stage of development	1		Early
	2		Blastocyst
	3		Expanded
	4		Hatched/hatching
ICM	1	Good	Prominent, easily discernible, with many cells that are compacted and tightly adhered together
	2	Fair	Easily discernible, with many cells that are loosely grouped together
	3	Poor	Difficult to discern, with few cells
TE	1	Good	Many cells forming a cohesive epithelium
	2	Fair	Few cells forming a loose epithelium
	3	Poor	Very few cells

Tableau II : Système de notation des embryons au stade blastocyste (Alpha/ESHRE)

Néanmoins, ces évaluations ont une variabilité inter individuelle importante (7). L'évaluation est subjective et l'expérience du biologiste de la reproduction est importante. Afin de réduire les variations inter laboratoires et dans le but d'harmoniser les pratiques, la morphologie embryonnaire doit être évaluée à des moments précis après l'insémination / injection (6). Cependant, pour des raisons pratiques, un intervalle de plus ou moins une heure est toléré. Or, il a été montré que des changements morphologiques importants pouvaient avoir lieu en deux heures (8). En regardant l'évolution de 212 embryons entre 40 et 42 heures post insémination, 32,6 % des embryons montraient une évolution morphologique. Les observations statiques sont donc toujours soumises au risque de ne pas être effectuées au bon moment. Des évènements importants du développement embryonnaire peuvent également être omis (divisions anormales, première division cellulaire précoce, présence de cellules multinucléées, fusions cellulaires…).

Malgré le grand nombre d'évaluations morphologiques de la qualité embryonnaire décrites dans la littérature, le pouvoir discriminant de ces évaluations reste modéré, aussi bien pour le stade précoce que pour le stade blastocyste. L'évaluation du potentiel d'implantation d'un embryon par sa morphologie reste imparfaite. En 2011, la morphologie de la masse cellulaire interne était considérée comme le paramètre principal à prendre en compte lors d'un transfert embryonnaire car les cellules de la masse cellulaire interne sont à l'origine du futur fœtus (9). Ahlström (10) a démontré ensuite qu'un trophectoderme de bonne qualité était essentiel à l'implantation et qu'il devait être privilégié à la masse cellulaire interne lors du choix de l'embryon à transférer. En 2013, Van den Abbeel (11) a étudié les issues de 618 transferts monoembryonnaires en fonction des différents paramètres morphologiques des blastocystes transférés (expansion, masse cellulaire interne et trophectoderme). Bien que les 3 paramètres soient significativement associés aux taux de grossesses cliniques et évolutives, l'expansion du blastocyste était le seul paramètre significatif corrélé aux taux de naissances vivantes.

De plus, il faut également noter qu'une part non négligeable d'embryons morphologiquement normaux sont aneuploïdes. Une étude de Schoolcraft suggère qu'un peu plus de 50 % des blastocystes le sont (12). Fragouli (13) retrouve des résultats similaires : 61,2 % des blastocystes ayant une bonne morphologie sont euploïdes. Staessen (14) a étudié l'euploïdie des embryons chez des femmes de plus de 36 ans. Il a montré que 65 % des blastocystes expansés au 5ème jour de développement étaient génétiquement normaux contre 41,3% pour les embryons présentant 8 cellules au 3ème jour de développement. Une sélection relative des embryons s'effectuerait donc en prolongeant la culture embryonnaire. Capalbo (15) a étudié la corrélation entre la morphologie, l'euploïdie et l'implantation de 956 blastocystes. Le pourcentage de blastocystes euploïdes augmente parallèlement à la qualité embryonnaire, néanmoins, aucun des paramètres utilisés pour l'évaluation morphologique des blastocystes n'est prédictif de l'euploïdie embryonnaire et aucune différence n'a été retrouvée entre les différents pourcentages d'implantation des embryons euploïdes en fonction de leur morphologie. De plus, le délai d'obtention d'un blastocyste n'était pas corrélé aux éventuelles anomalies chromosomiques.

Il est donc nécessaire d'améliorer les techniques d'évaluation de la qualité embryonnaire, tout en tenant compte des impératifs réglementaires et financiers.

Afin d'améliorer la sélection embryonnaire, des modèles prédictifs de l'implantation embryonnaire ont été construits à partir d'observations statiques. Van Loendersloot (16) a élaboré un algorithme basé sur cinq facteurs : la présence ou l'absence d'un clivage précoce, le nombre de blastomères au 2ème et au 3ème jour de développement, un score attribué à l'embryon basé sur le pourcentage de fragmentation et la régularité des blastomères au 3ème jour de développement, et la présence ou non d'une morula au 3ème jour de développement. L'algorithme attribue à chaque embryon un score qui serait prédictif de son potentiel d'implantation. Il serait donc, selon son auteur, un outil pour aider le biologiste de la reproduction à choisir quels embryons transférer ou vitrifier.

Transfert monoembryonnaire

L'objectif d'une prise en charge en A.M.P. est la naissance vivante d'un enfant en bonne santé. Aussi, pour augmenter les taux de grossesses, certaines équipes privilégient le transfert de plusieurs embryons (généralement deux). Cependant, cette politique augmente les risques de grossesses multiples ainsi que leurs conséquences (non exhaustives) : risque accru de diabète gestationnel, d'hypertension artérielle et de pré-éclampsie pour la femme enceinte ; accouchement prématuré et retard de croissance intra-utérin pour le fœtus. Ainsi, la mise en place progressive d'une politique de transfert d'un seul embryon (transfert monoembryonnaire = single embryo transfer = S.E.T.) se développe actuellement afin de limiter les grossesses multiples et leurs conséquences médicales et économiques.

Une méta analyse de Mc Lernon (17) a comparé l'efficacité du S.E.T. et du transfert de deux embryons (double embryo transfer = D.E.T.) en confrontant les taux de naissances vivantes, les taux de naissances vivantes multiples et les taux cumulés de naissances vivantes après transferts d'embryons frais et congelés. Bien que le taux de naissances vivantes soit moins élevé après transfert d'un seul embryon, il n'y a pas de différence significative après un cycle supplémentaire de transfert d'embryon congelé comparé au transfert simultané de deux embryons frais. Néanmoins, le taux de naissances multiples est beaucoup plus élevé après le transfert de deux embryons qu'après le transfert d'un seul embryon où il est comparable au taux faible observé dans les grossesses spontanées.

Il semble donc légitime de poursuivre la mise en place de cette stratégie de S.E.T.

Transfert au stade précoce ou au stade blastocyste

Grâce à l'amélioration des compositions des milieux de culture et des conditions de culture, la stratégie de transfert embryonnaire évolue progressivement vers un recours accru à la culture embryonnaire prolongée.

La culture jusqu'au stade blastocyste n'est pourtant pas récente : la première naissance vivante rapportée après transfert d'un blastocyste date de 1985.

In vivo, les embryons traversent les trompes de Fallope et n'atteignent pas l'utérus avant l'étape de morula, ce qui équivaut à au moins 4 jours de culture in vitro. L'utérus fournit un environnement nutritionnel différent de l'oviducte. Il est donc physiologiquement prématuré d'exposer les embryons de stade précoce à l'environnement utérin, en particulier celui qui a été soumis à une stimulation multifolliculaire et donc à des niveaux élevés d'œstrogènes (18). Par conséquent, nous pouvons penser que l'environnement utérin peut causer un stress sur l'embryon s'il est transféré à un stade précoce et entraîner une baisse de son potentiel d'implantation. Il a également été mis en évidence une réduction significative de la pulsatilité utérine 7 jours après l'ovulation, c'est à dire au moment où les blastocystes sont transférés (19). Il est possible que cette relaxation des muscles utérins favorise l'implantation du blastocyste.

Le transfert au stade blastocyste permet également d'améliorer la sélection des embryons transférés en éliminant les embryons ayant arrêté leur développement entre le 3ème et 5ème jour. En effet, le génome embryonnaire est silencieux lors des 2-3 premiers jours du développement embryonnaire (20), aussi, l'embryon se développe grâce aux transcrits maternels contenus dans le cytoplasme de l'ovocyte. A partir du stade 8 cellules, la transcription du génome embryonnaire s'active de façon progressive, permettant le développement de l'embryon jusqu'au stade blastocyste.

Une méta-analyse conduite par Glujovsky en 2016 (21) compare les transferts d'embryons au stade blastocyste et au stade précoce. Les taux de grossesses cliniques et de naissances vivantes sont significativement plus élevés après transfert frais d'un blastocyste comparé au transfert d'un embryon au stade précoce. Il n'y a néanmoins pas de différence significative sur les taux cumulés de grossesses cliniques et de naissances vivantes. Le transfert au stade de blastocyste est associé à une diminution du nombre d'embryons congelés par rapport au stade de J2/J3 (stockage massif improductif). La grossesse est donc obtenue plus rapidement en réduisant le nombre de transferts d'embryons congelés.

De plus, les fausses couches spontanées sont significativement plus fréquentes après le transfert d'un embryon précoce comparé au transfert d'un blastocyste (22).

Notons qu'il n'existe pas d'étude médico-économique comparant l'efficience des transferts d'embryons au stade précoce et au stade blastocyste.

Bien que de nombreuses observations soient nécessaires afin de mieux suivre le développement embryonnaire, chacune d'elles implique l'exposition de l'embryon à des conditions de culture sous-optimales, pouvant affecter le développement embryonnaire. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, l'évaluation du potentiel d'implantation d'un embryon par sa morphologie reste imparfaite. Les biologistes de la reproduction, conscients de ces limites, ont orienté leurs recherches au cours de ces dernières années vers de nouveaux marqueurs non invasifs du développement embryonnaire afin d'améliorer la sélection des embryons et donc augmenter les taux de grossesses cliniques et de naissances vivantes. Parmi ceux-ci, la sélection embryonnaire basée sur des marqueurs morphocinétiques est actuellement en plein essor.

Time Lapse (analyse morphocinétique du développement embryonnaire)

La technologie Time Lapse (système d'enregistrement continu du développement embryonnaire) est apparue à la fin des années 2000 en embryologie clinique et a permis un regard nouveau sur l'évaluation de la qualité embryonnaire. La technologie Time Lapse permet d'enregistrer le développement embryonnaire à intervalle régulier sans sortir l'embryon de son incubateur. Cette avancée technologique a conduit les biologistes de la reproduction à passer de l'observation statique et ponctuelle des embryons à l'observation dynamique et en continu.
Le biologiste de la reproduction a ainsi accès à un nombre plus important d'informations sur le développement embryonnaire comparé aux différentes observations morphologiques ponctuelles. Les informations disponibles grâce à l'analyse morphocinétique des embryons pourraient selon certains auteurs (23) améliorer la sélection embryonnaire au laboratoire et ainsi augmenter les taux d'implantation et les taux de naissances vivantes en A.M.P.

Les systèmes Time Lapse combinent trois éléments de base : un incubateur, un microscope et un logiciel d'acquisition et d'analyse des images.

Il existe trois configurations possibles de système Time Lapse (24) :

1) Un incubateur est construit autour d'un microscope disponible dans le commerce. Cependant, la stabilité de l'environnement de la culture embryonnaire, bien que suffisante pour la recherche, n'est pas optimale pour une utilisation clinique.
2) Le microscope est inséré dans un incubateur disponible dans le commerce (exemple : système Primovision™, Vitrolife®).
3) Un instrument intègre tous les appareils (exemples : Embryoscope®, Vitrolife® ; Geri®, Genea Biomdx® ou Miri®, Esco®).

Système Primovision™

Système Embryoscope®

Système Geri®

Système Miri®

Les systèmes Time Lapse ont pour avantages l'amélioration des conditions de culture par rapport à un incubateur standard, et l'évaluation dynamique des embryons sans les sortir de l'incubateur. Ils permettent la détection des évènements anormaux du développement embryonnaire, non détectables en microscopie classique (clivage précoce, divisions anormales, fusions cellulaires…), permettant ainsi d'exclure des embryons présentant un développement anormal. Ces phénomènes ne sont observables qu'à l'aide des systèmes Time Lapse. Nous pouvons citer par exemple l'étude de Rubio (25) qui étudie les taux d'implantation des embryons présentant un délai inférieur à 5 heures entre le stade 2 cellules et le stade 3 cellules (sachant que la durée d'un cycle cellulaire est d'environ 10-12

heures). Le pourcentage d'implantation de ces embryons est significativement plus bas (1,2 %) comparé aux autres embryons (20,2 %). Liu (26) a étudié les embryons présentant des fusions cellulaires au cours de leur développement. Le pourcentage d'implantation de ces embryons est significativement inférieur au pourcentage obtenu pour les embryons ne présentant pas de fusions cellulaires au cours de leur développement.

Les systèmes Time Lapse permettent également une flexibilité dans l'organisation du laboratoire. Les images sont en effet sauvegardées permettant ainsi un visionnage différé du développement embryonnaire.

Le C.H.U. de Nantes a acquis un premier Embryoscope® en 2011 et un second en 2014. L'Embryoscope® est une combinaison d'un incubateur tri gaz et d'une caméra. L'incubateur fournit des conditions de culture stables nécessaires au développement embryonnaire et la caméra collecte des images à intervalles réguliers sur sept plans focaux différents. Les différentes images sont ensuite intégrées dans un logiciel permettant la réalisation d'un film montrant l'évolution des embryons.
Les deux Embryoscope® utilisés au C.H.U. de Nantes permettent l'observation simultanée de 144 embryons (72 dans chaque Embryoscope®).

Ottosen (27) a démontré que les longueurs d'onde inférieures à 550 nm inhibaient le développement embryonnaire, notamment en induisant la production d'H_2O_2. La lumière utilisée en microscopie optique pour l'observation des embryons est composée à environ 10 % de longueurs d'onde inférieures à 500 nm.
La source lumineuse de l'Embryoscope® est une LED qui produit une longueur d'onde égale à 635 nm. La lumière fournie par cette LED permet donc d'éliminer les longueurs d'ondes dommageables pour l'embryon. Bien que régulièrement exposés à la lumière, les embryons présents dans l'Embryoscope® sont donc exposés à une

lumière moins nocive qu'en microscopie classique. De plus, la durée cumulée d'exposition est inférieure à celle observée en microscopie conventionnelle, malgré les prises de vue répétées toutes les 15 à 20 minutes.
Néanmoins, lorsque l'on compare des embryons cultivés dans un incubateur standard avec ceux cultivés à l'aide d'un système Time Lapse, nous ne trouvons pas de différence significative concernant les taux de grossesse (28). Ces résultats suggèrent donc que l'exposition périodique à la lumière du microscope ne nuit pas à la qualité embryonnaire.

Les systèmes Time Lapse présentent également quelques inconvénients. En effet, des bulles d'air peuvent se former à l'intérieur des boîtes de culture, gênant ainsi l'observation des embryons. Les embryons peuvent également se trouver partiellement hors du champ de vision de la caméra. Selon les systèmes utilisés, les embryons sont observés sur un seul plan focal (Primovision™) ou sur plusieurs champs focaux (Embryoscope®). L'appréciation de la qualité embryonnaire peut être alors difficile. De plus, l'embryon ne peut pas être tourné, ce qui peut parfois limiter son observation au stade blastocyste expansé.

Aneuploïdie et Time Lapse

L'aneuploïdie joue un rôle majeur dans les échecs d'implantation et les fausses couches précoces. La corrélation entre le développement embryonnaire et une anomalie chromosomique n'est pas un concept nouveau en embryologie. Cependant, cette relation a été établie dans le passé uniquement sur la base d'observations statiques.

Les études s'intéressant aux relations entre morphocinétique et anomalies chromosomiques sont contrastées. Des études montrent des associations entre des paramètres morphocinétiques et le statut chromosomique des embryons, bien que ces paramètres soient différents entre les études (29) (30) (31). Au contraire, d'autres études ne montrent aucune corrélation entre les paramètres morphocinétiques et le statut chromosomique d'un embryon (32) (33).

De plus, Lagalla (34) a montré que les embryons présentant un développement morphocinétique anormal pouvaient se développer en blastocystes euploïdes.

Algorithmes morphocinétiques prédictifs

Après la mise sur le marché des systèmes Time Lapse et compte tenu de la quantité importante de données générées, des algorithmes ont été développés afin de faciliter et d'améliorer la sélection des embryons (23) (35) (36) (37). Ces modèles ont pour but d'aider le biologiste de la reproduction à choisir quels embryons transférer ou vitrifier.

Les algorithmes prédictifs de l'implantation ont été développés à partir de transferts embryonnaires d'issue certaine (K.I.D. = Known Implantation Data ; pas d'implantation, implantation d'un embryon dans le cas d'un S.E.T. ou implantation de deux embryons dans le cas d'un D.E.T.), permettant de garantir l'association entre l'implantation des embryons et leurs paramètres morphocinétiques.

Néanmoins, la plupart de ces algorithmes sont basés sur peu de données (98 à 754 embryons) et très peu ont été testés dans une étude prospective randomisée (38) (39). Bien que de nombreux modèles aient été publiés, peu ont fait l'objet d'une validation dans un autre centre (40) (41) et la plupart de ces validations ont montré des résultats modestes.
Ces algorithmes ont comme principal inconvénient de ne pas être superposables d'un centre à l'autre en raison de l'impact des conditions de culture sur les paramètres morphocinétiques (42) (43).

Afin de construire un algorithme superposable d'un centre à l'autre, il faut donc collecter un très grand nombre de données issues de différents centres d'A.M.P. afin de s'affranchir des différences existantes entre ces centres. Les algorithmes KID Score™ Day 3 et KID Score™ Day 5 ont été développés dans ce but.

KID Score ™ Day 3 et KID Score ™ Day 5

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à deux algorithmes morphocinétiques développés par la société Vitrolife® pour l'Embryoscope: le KID Score™ Day 3 et le KID Score™ Day 5.

1) KID Score™ Day 3

Le KID Score™ Day 3 est un algorithme morphocinétique proposé aux utilisateurs de l'Embryoscope® depuis environ 3 ans. Il a été développé à l'aide d'un panel de 3275 embryons provenant de 24 centres différents, dont le C.H.U. de Nantes, transférés au 3ème jour de développement. Les embryons ont tous été cultivés à l'aide d'Embryoscope® et analysés à l'aide du logiciel d'acquisition des images de l'Embryoscope®. L'issue de leur implantation a été récupérée pour l'ensemble des embryons (KID = Know Implantation Data). La présence d'un sac gestationnel avec une activité cardiaque a été retenue comme critère d'implantation. Le KID Score™ Day 3 est basé sur une annotation morphologique (présence des 2 pronuclei) et cinq annotations morphocinétiques (tPNf : temps entre l'injection et l'effacement des pronuclei, t2 : temps pour obtenir 2 cellules, t3, t5 et t8) (figure III).

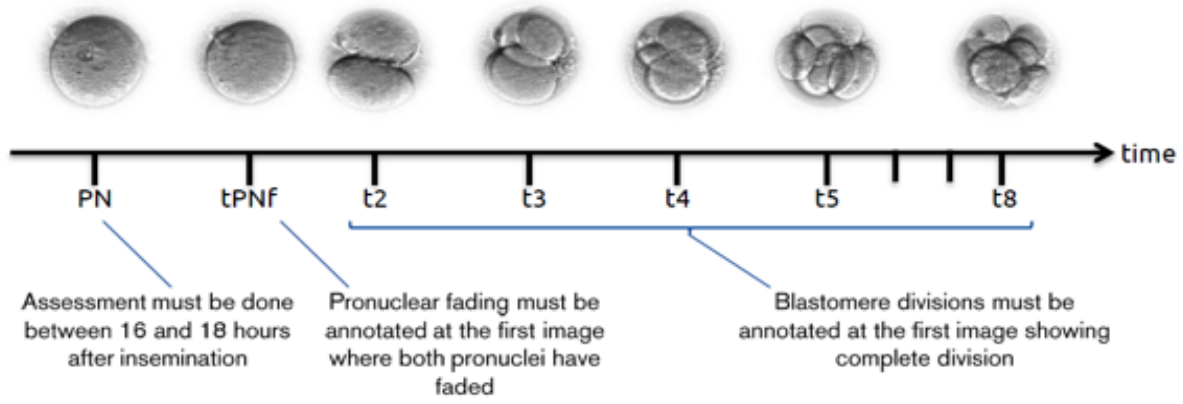

Figure III : Technote du KID Score™ Day 3, Vitrolife®

Le détail de cet algorithme et sa performance ont été publiés en 2016 (44) (figure IV). Le KID Score™ Day 3 attribue aux différents embryons d'une cohorte un score allant de 0 à 5 (tableau III). Le potentiel d'implantation de l'embryon augmenterait parallèlement avec ce score. Ainsi, le score obtenu serait une aide pour le biologiste de la reproduction pour choisir quels embryons transférer ou vitrifier.

Les données ayant été collectées dans 24 centres différents, cet algorithme serait directement applicable dans n'importe quel centre d'A.M.P. possédant un Embryoscope®.

Figure IV : Algorithme du KID Score™ Day 3 selon Petersen et *al.* (44)

Score	Interpretation
0	The embryo is not 2PN
1	Initial development was too fast or embryo displayed a direct cleavage from one to three cells
2	The embryo was very slow to develop
3	Embryo development was irregular and developmental pace increased from day 2 to day 3
4	Embryo development was irregular and developmental pace slowed down from day 2 to day 3 (And/or) The number of cells annotated at 66 h was not as expected
5	The embryo passed all of the avoidance criteria included in the model

Tableau III : Technote du KID Score™ Day 3, Vitrolife®

Un total de 11 218 embryons provenant de 31 centres différents et cultivés jusqu'au cinquième jour de développement ont permis de tester la capacité du KID Score™ Day 3 à prédire la formation d'un blastocyste (44).

Les blastocystes obtenus ont été classés en 3 groupes : un groupe Top Quality (TQ), un groupe Good Quality (GQ) et un groupe Poor Quality (PQ). Le groupe TQ comprenait les blastocystes B3/4/5 AA, le groupe GQ les blastocystes B3/4/5 BB, AB ou BA. Les blastocystes ayant un développement moins avancé ont été classés dans le groupe PQ.

Petersen (44) a observé une corrélation entre le score attribué par l'algorithme et la capacitation de l'embryon à atteindre les stades TQ et GQ. Dans son étude, le pourcentage d'embryons atteignant le stade blastocyste au 5ème jour de développement et leur qualité augmentent parallèlement au score attribué par l'algorithme (KID Score et pourcentage de blastocystes obtenus à J5 respectivement égal à 1 et 13 % ; 2 et 23,5 % ; 3 et 27,9 % ; 4 et 35,9 % ; 5 et 67,3 %).

2) KID Score™ Day 5

Le KID Score™ Day 5 est un algorithme morphocinétique proposé par Vitrolife® mais dont le détail n'a pas été publié à ce jour. Il a été développé à l'aide d'un panel de 1 100 embryons cultivés et transférés au 5ème jour de développement. Cet algorithme est basé sur 10 annotations (figure V) : 8 annotations morphocinétiques (PNf, t2, t3, t4, t5, t8, tSB : première image montrant une cavité i.e. début de la blastulation, tB : dernière image avant amincissement de la zone pellucide) et 2 annotations morphologiques (présence des 2 pronuclei, évaluation de la masse cellulaire interne et du trophectoderme entre 115 et 120h post injection). La masse cellulaire interne et le trophectoderme sont annotés A, B ou C selon la classification de Gardner and *al* (4).

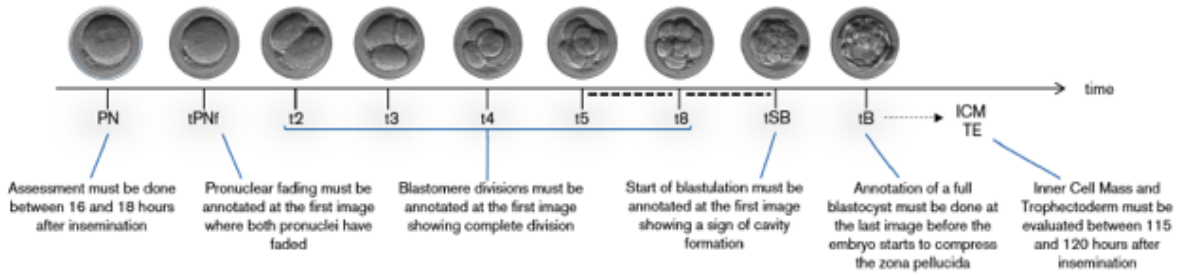

Figure V : Technote du KID Score™ Day 5, Vitrolife®

Comme le KID Score™ Day 3, cet algorithme analyse le développement embryonnaire et attribue un score à chaque embryon compris entre 0 et 6 (tableau IV). Ce score augmenterait parallèlement avec le potentiel d'implantation de l'embryon et serait une aide pour le biologiste de la reproduction afin de choisir quels embryons transférer ou vitrifier. Cet algorithme permettrait donc de réduire le nombre d'embryons transférés ou vitrifiés en écartant les embryons ayant un faible pouvoir d'implantation. Tout comme le KID Score™ Day 3, il ne rejette aucun embryon mais les classe selon leur probabilité d'implantation.

Score	Description
0	The embryo is not 2PN.
1	The embryo had *not* reached the expected development stage at 115 hours and/or the early development pattern was irregular.
2	The embryo had *not* reached the expected development stage at 115 hours. However, the early development pattern was regular.
3	The embryo had reached the expected development stage at 115 hours. However, the embryo displayed an irregularity during the culture period, either in the early or late development pattern
4	The embryo had reached the expected development stage at 115 hours. The overall morphology was mediocre while the early development pattern displayed no or only moderate irregularity during the culture period.
5	The embryo had reached the expected development stage at 115 hours. The overall morphology was satisfactory while the early development pattern displayed a moderate irregularity during the culture period.
6	The embryo passed all of the avoidance criteria included in the model. The embryo had reached the expected development stage at 115 hours and the overall morphology was satisfactory. The development pattern displayed no irregularity.
N/A	One or more of the mandatory annotation variables could not be assessed or were not annotated by the embryologist.

Tableau IV : Technote du KID Score™ Day 5, Vitrolife®

OBJECTIFS

Différentes équipes se sont intéressées à l'évaluation des algorithmes morphocinétiques prédictifs de l'implantation des embryons. La plupart de ces études ont montré des résultats modestes, notamment dus à des conditions de culture différentes entre les laboratoires et aux limites de ces modèles développés sur des populations restreintes et monocentriques. Aussi, la création d'un algorithme « universel », conçu à partir d'une importante base de données et indépendant des conditions de culture, génère une grande attente des professionnels de l'A.M.P. afin d'améliorer les taux de naissances vivantes.

Ce travail a pour objectif principal la validation externe de deux modèles prédictifs proposés par la société Vitrolife® pour l'Embryoscope® : le KID Score™ Day 3 pour la prédiction de la blastulation des embryons et le KID Score™ Day 5 pour la prédiction de l'implantation des embryons.

L'objectif secondaire de ce travail est l'évaluation de l'intérêt prédictif du KID Score™ Day 3 pour l'implantation des embryons après transfert au 5ème jour de développement.

Ce travail a été réalisé dans un contexte particulièrement favorable au sein du service de biologie et médecine de la reproduction du C.H.U. de Nantes. En effet, la stratégie de transfert de ce centre d'A.M.P. est de garder tous les embryons en culture prolongée et de réaliser quasi systématiquement des transferts monoembryonnaires au stade blastocyste, permettant ainsi l'étude du KID Score™ Day 3 et Day 5. L'expertise acquise dans les systèmes Time Lapse, et plus particulièrement de l'Embryoscope® depuis 2011, a été un atout majeur.

Ce travail a également été l'occasion d'analyser les données de la littérature existantes sur les différents modèles prédictifs publiés.

MATERIELS ET METHODES

Critères de sélection

Cette étude monocentrique rétrospective a porté sur tous les couples ayant bénéficié d'une F.I.V.-I.C.S.I. avec suivi du développement embryonnaire à l'aide de l'Embryoscope® au C.H.U. de Nantes durant la période du 1er janvier 2013 au 31 décembre 2016.
Lors de cette période, l'inclusion des embryons dans l'Embryoscope® se faisait en fonction des places disponibles le jour de la ponction. Il n'y a pas eu de critère d'inclusion spécifique pour les couples ayant bénéficié de la technologie Time Lapse.

Pour l'évaluation du KID Score™ Day 5, les critères d'inclusion des couples étaient les suivants :

- F.I.V.-I.C.S.I. avec suivi du développement embryonnaire à l'aide du système Time Lapse Embryoscope®
- Transfert frais d'un seul embryon
- Transfert au 5ème jour de développement
- Issue du transfert connue

Les critères d'exclusion étaient les suivants :

- Couples pris en charge en Diagnostic Pré Implantatoire
- Transfert frais au 2ème, 3ème, 4ème ou 6ème jour de développement
- Absence de transfert
- Transfert de plusieurs embryons
- Transfert frais monoembryonnaire dont l'issue était inconnue.

Pour l'évaluation du KID Score™ Day 3, nous avons retenu les cohortes embryonnaires des couples inclus dans l'étude du KID Score™ Day 5. Tous les embryons de la cohorte ayant été cultivés jusqu'au 5ème jour de développement ont été inclus dans notre étude, quelle que soit leur qualité (figure VI et VII).

L'ensemble des données clinico-biologiques ont été extraites à partir du logiciel MediFirst®.

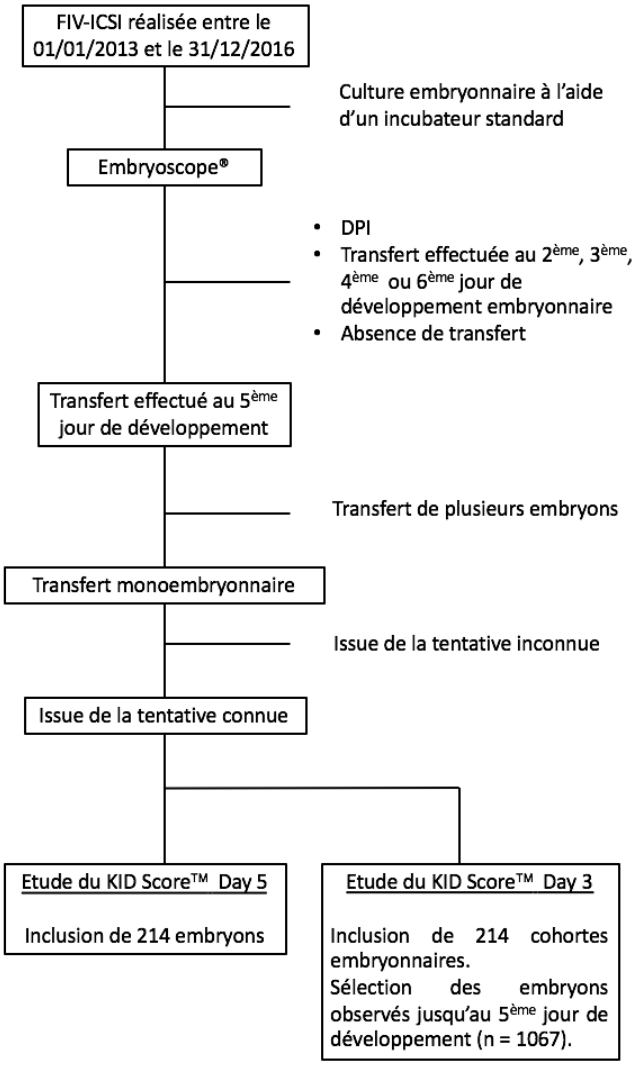

Figure VI : Critères de sélection des embryons pour les études des KID Score™ Day 3 et KID Score™ Day 5

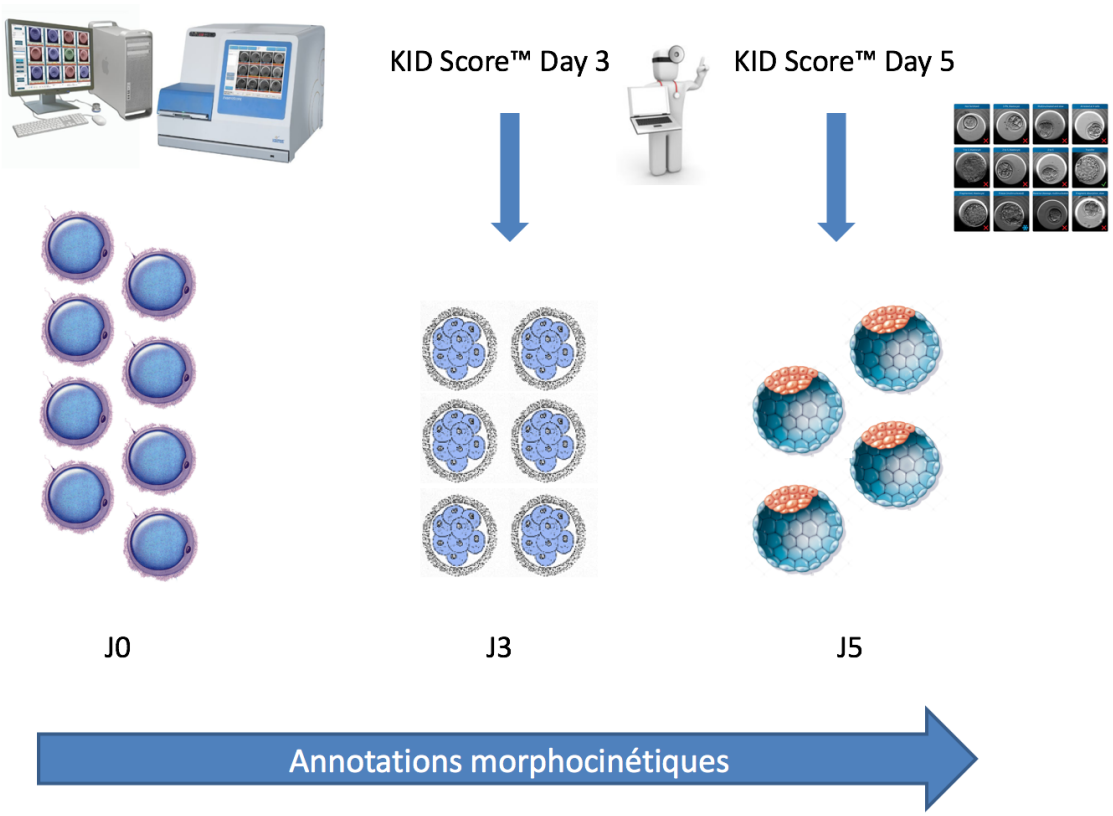

Figure VII : Jours d'application des algorithmes KID Score™ Day 3 et KID Score™ Day 5.

Stratégie de prise en charge

Au sein du centre d'A.M.P. du C.H.U. de Nantes, le transfert frais monoembryonnaire d'un blastocyste est proposé dans plus de 90 % des cas. Seuls les couples refusant cette stratégie ont un transfert d'un embryon précoce (< 5%). Le transfert de deux blastocystes est très rarement indiqué (< 5%).

Toutes les patientes ont été stimulées à l'aide d'un protocole de stimulation ovarienne contrôlée. Les protocoles antagonistes sont préférentiellement utilisés par rapport aux protocoles agonistes courts ou longs.

Dans le cas d'un protocole antagoniste, après désensibilisation de l'axe hypothalamo-hypophysaire à l'aide de Provames®, des injections quotidiennes de

gonadotrophines sont effectuées. La dose est choisie en fonction de l'âge de la patiente, de son poids, de son IMC, de sa réserve ovarienne et des réponses aux précédentes stimulations réalisées. Un antagoniste de la GnRH est introduit au 6ème jour de stimulation. Des contrôles échographiques et des dosages hormonaux sont réalisés périodiquement afin de suivre la stimulation multifolliculaire.
Quand une cohorte optimale de follicules antraux est observée à l'échographie (au moins 3 follicules > 17 mm), l'ovulation est déclenchée par administration d'rHCG (Ovitrelle®, Merck Serono®). La ponction ovocytaire est réalisée 36 heures plus tard au bloc opératoire sous contrôle échographique. Les complexes cumulo-ovocytaires ainsi collectés sont rincés puis décoronisés à l'aide d'une enzyme : la hyaluronidase (SynVitro™ Hyadase, Origio®). La maturité ovocytaire est évaluée, après décoronisation, par la présence ou l'absence d'un globule polaire. Ce globule polaire est le seul témoin morphologique de la reprise de la méiose par l'ovocyte après injection de rHCG. Seuls les ovocytes présentant un globule polaire seront retenus pour la microinjection. Une fois celle-ci réalisée, les embryons sont introduits dans l'Embryoscope®. Ils sont cultivés jusqu'au stade blastocyste avec des milieux de culture séquentiels (G1-G2 media®, Vitrolife®) sous des conditions contrôlées (37°C, 6% CO2 et 5% O2).

Annotation des embryons

Les embryons ont été annotés individuellement et rétrospectivement sur le logiciel d'acquisition des images de l'Embryoscope®. Les annotations nécessaires pour l'obtention du KID Score™ Day 3 et KID Score™ Day 5 ont été décrites dans l'introduction.

La classification de Gardner et Schoolcraft (4) (figure VIII) a été utilisée pour l'évaluation morphologique des blastocystes à J5. Pour être concordant avec l'extraction des données via le logiciel MediFirst®, l'annotation, réalisée en double lecture par un biologiste de la reproduction et un technicien expérimenté le jour du transfert, a été retenue.

Le degré d'expansion du blastocyste est classé selon 6 stades différents :

- B1 : apparition d'une cavitation ; le blastocèle représente moins de 50 % du volume de l'embryon
- B2 : le blastocèle représente plus de 50 % du volume de l'embryon
- B3 : blastocyste expansé
- B4 : blastocyste expansé et amincissement de la zone pellucide
- B5 : blastocyste en voie d'éclosion
- B6 : blastocyste éclos

Le bouton embryonnaire est noté à l'aide d'une lettre :

- A : cellules nombreuses et compactes
- B : quelques cellules lâches
- C : peu de cellules

Le trophectoderme :

- A : nombreuses cellules cohésives
- B : quelques cellules lâches
- C : peu de cellules

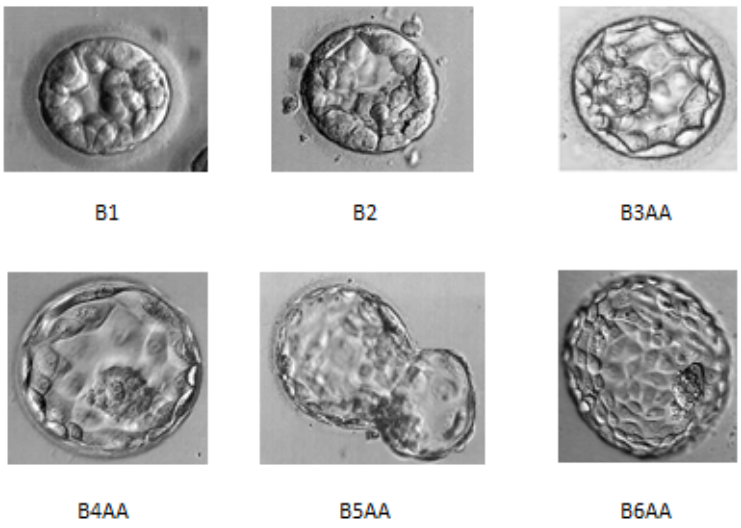

Figure VIII : Classification de Gardner et Schoolcraft (1999)

Au 5ème jour de développement, les blastocystes présentant une expansion supérieure ou égale au stade B2 peuvent être transférés à l'exception de ceux ayant un trophectoderme classé C. Dans le cadre de cette étude, nous avons uniquement sélectionné les transferts monoembryonnaires effectués à J5. Les autres blastocystes de bonne qualité obtenus à J5 ont été vitrifiés en se basant sur les mêmes critères de sélection morphologique.

Pour l'analyse de nos résultats, nous avons également repris le classement des blastocystes publié dans l'étude de Petersen (44) que nous avons décrit dans l'introduction.

Taux d'implantation

Un dosage de βhCG est réalisé 11 ou 12 jours après le transfert embryonnaire et renouvelé toutes les 48h jusqu'à atteindre le seuil de 1000 UI/L. Une grossesse clinique est confirmée grâce à une échographie 4 à 5 semaines plus tard, en mettant en évidence un sac gestationnel et une activité cardiaque. Le taux d'implantation dans notre étude est défini comme le nombre de sac gestationnel avec activité fœtale cardiaque sur le nombre d'embryon transféré (égal à 1 dans notre étude).

Méthodologie statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism5® (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Le test t de Student et le test du χ^2 ont été utilisés lorsqu'ils étaient appropriés. Une valeur $p < 0.05$ a été considérée comme significative.

Le logiciel Excel® a été utilisé pour trier les données et élaborer les figures et les tableaux.

RESULTATS

Population observée

A partir des critères de sélection, nous avons pu inclure 210 couples dans notre étude. 214 transferts frais monoembryonnaires, réalisés au 5ème jour de développement, ont permis l'évaluation du KID Score™ Day 5 et 1067 embryons ont été inclus pour l'étude du KID Score™ Day 3.

L'âge moyen des patientes était de 32,3 ans (+/- 4).

KID Score ™ Day 3

1) Evaluation de l'intérêt prédictif du KID Score™ Day 3 sur la blastulation des embryons

Le score attribué par le KID Score™ Day 3 à chaque embryon serait prédictif de sa capacité à former un blastocyste (44). Nous avons donc étudié les taux de blastulation des 1067 embryons inclus dans notre étude.

Premièrement, nous avons retenu comme critère d'évaluation l'obtention ou l'absence d'un blastocyste au 5ème jour de développement, quelle que soit la qualité morphologique. L'association entre le KID Score™ Day 3 et le taux de blastulation est représentée dans la figure IX.

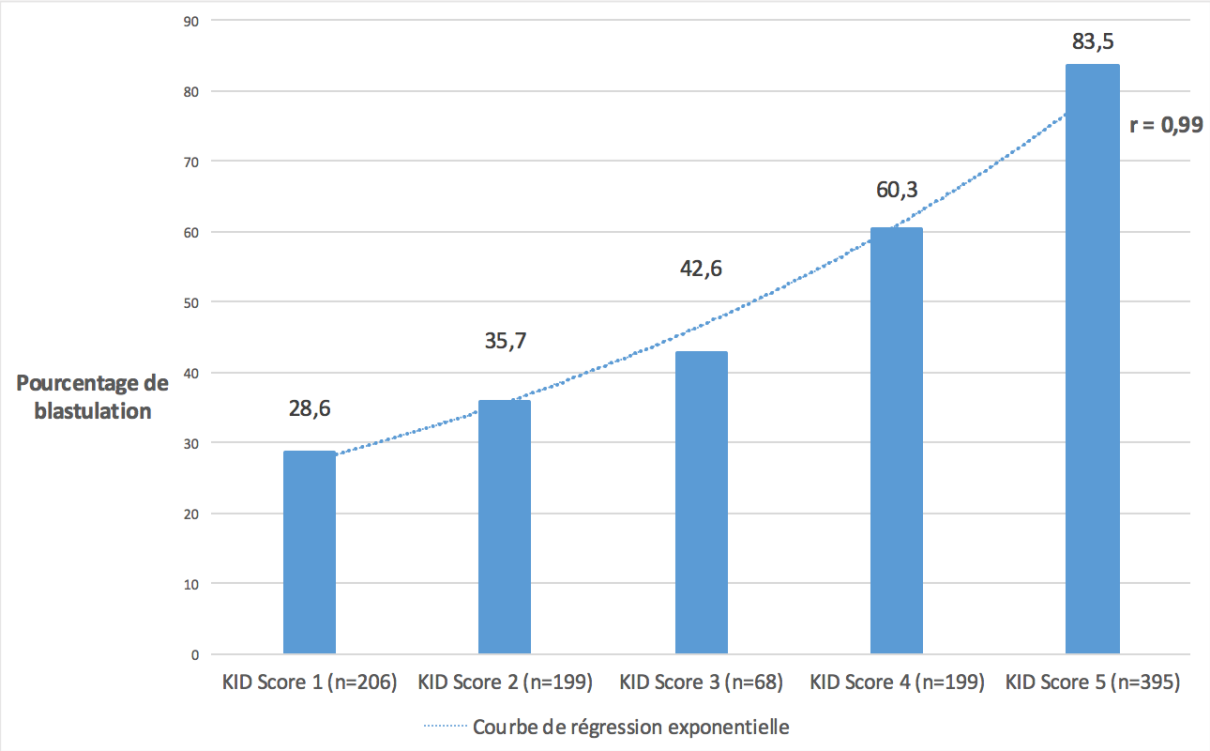

Figure IX : Pourcentage de blastulation des embryons en fonction du KID Score™ Day 3 (n = 1067).

Nous observons une très forte corrélation positive entre le KID Score™ Day 3 et les taux de blastulation (r = 0,99 ; p = 0,001). Des différences significatives ont été mises en évidence entre les différents pourcentages observés (p < 0,05), à l'exception du pourcentage obtenu dans le groupe du KID Score 2 qui n'était pas significativement différent des pourcentages de blastulation obtenus dans le groupe du KID Score 1 (p = 0,13) et dans le groupe du KID Score 3 (p = 0,30).

Nous avons ensuite comparé nos résultats obtenus avec les résultats obtenus dans la publication de référence (44) à l'aide d'un test du χ^2 (tableau V).

	Pourcentage de blastulation observé au C.H.U. de Nantes	Pourcentage de blastulation publié par Petersen et *al.*	p
KID Score 5	83,5 (n=395)	67,3 (n=4401)	<0.0001
KID Score 4	60,3 (n=199)	35,9 (n=2235)	<0.0001
KID Score 3	42,6 (n=68)	27,9 (n=645)	0,0111
KID Score 2	35,7 (n=199)	23,5 (n=1403)	0,0002
KID Score 1	28,6 (n=206)	13,0 (n=1893)	<0.0001

Tableau V : Comparaison des pourcentages de blastulation obtenus au C.H.U. de Nantes et publiés par Petersen.

Nous obtenons des pourcentages de blastulation significativement plus élevés que ceux observés par Petersen et *al.* pour toutes les catégories.

Dans un second temps, nous avons analysé nos données en classant les blastocystes obtenus en deux groupes distincts : les blastocystes transférables (ou vitrifiables) au 5ème jour de développement selon nos critères morphologiques (expansion d'un blastocyste ≥ B2, trophectoderme A ou B) et ceux non transférables / non vitrifiables (tableau VI).

	Obtention d'un blastocyste transférable à J5	Absence de blastocyste transférable à J5	Total	Pourcentage de blastocyste transférable à J5
KID Score 5	259	136	395	65,6 %
KID Score 4	75	124	199	37,7 %
KID Score 3	9	59	68	13,2 %
KID Score 2	31	168	199	15,6 %
KID Score 1	27	179	206	13,1 %

Tableau VI : Nombre et pourcentage de blastocystes transférables à J5 en fonction du KID Score™ Day 3 (n = 1067).

Nous observons une forte corrélation positive entre le KID Score™ Day 3 et la probabilité d'obtenir un blastocyste de qualité compatible avec le transfert ou la vitrification ($r = 0,89$; $p = 0,04$).

Nous n'observons pas de différence significative entre les pourcentages des groupes KID Score 1, 2 et 3. En regroupant les groupes KID Score 1, 2 et 3, les pourcentages obtenus sont significativement différents entre les groupes KID Score 5, KID Score 4 et KID Score (1,2,3) (pourcentage de blastocyste transférable à J5 respectivement égal à 65,6 %, 37,7 % et 14,2 % ; $p < 0,0001$).

Nous avons ensuite séparé les blastocystes obtenus au 5ème jour de développement en 2 catégories selon la méthodologie employée dans la publication de référence (44) : les blastocystes « Top Quality » (TQ : B3/4/5 AA) associés aux blastocystes « Good Quality » (GQ : B3/4/5 AB, BA, BB), et les blastocystes « Poor Quality » (PQ : B1 ; B2 ; B3/4/5 avec bouton embryonnaire ou trophectoderme classé C).

Les pourcentages observés au C.H.U. de Nantes ont ensuite été comparés aux données personnelles (non publiées) de Petersen et *al*. à l'aide d'un test du χ^2 (figure X).

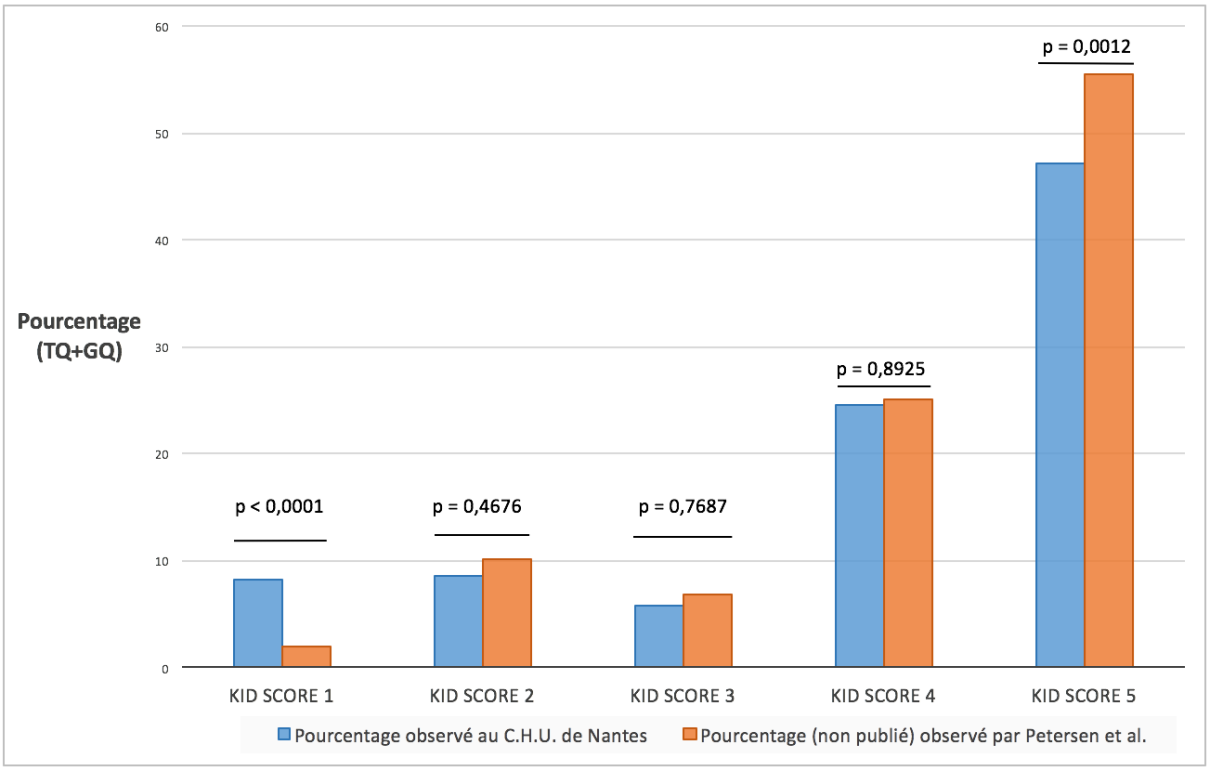

Figure X : Comparaison des pourcentages de blastocystes (TQ + GQ) en fonction du KID Score™ Day 3.

Nous obtenons des pourcentages significativement différents que ceux observés par Petersen et *al.* pour les catégories KID Score 1 et KID Score 5. Nous n'observons pas de différence significative pour les groupes KID Score 2, 3 et 4.

2) Evaluation de l'intérêt prédictif du KID Score™ Day 3 sur l'implantation des embryons lors d'un transfert frais effectué au stade blastocyste

Le score attribué par le KID Score™ Day 3 à chaque embryon serait prédictif de sa capacité à former un blastocyste (44).

Effectuant la majorité de nos transferts au 5ème jour de développement et le stade blastocyste étant un pré requis indispensable avant l'implantation, nous nous sommes donc demandés si cet algorithme pouvait prédire l'implantation des embryons transférés au 5ème jour de développement.

Nous avons donc soumis les 214 embryons sélectionnés pour l'étude du KID Score™ Day 5 à l'algorithme du KID Score™ Day 3. Les pourcentages d'implantation obtenus pour chaque score sont représentés dans la figure XI.

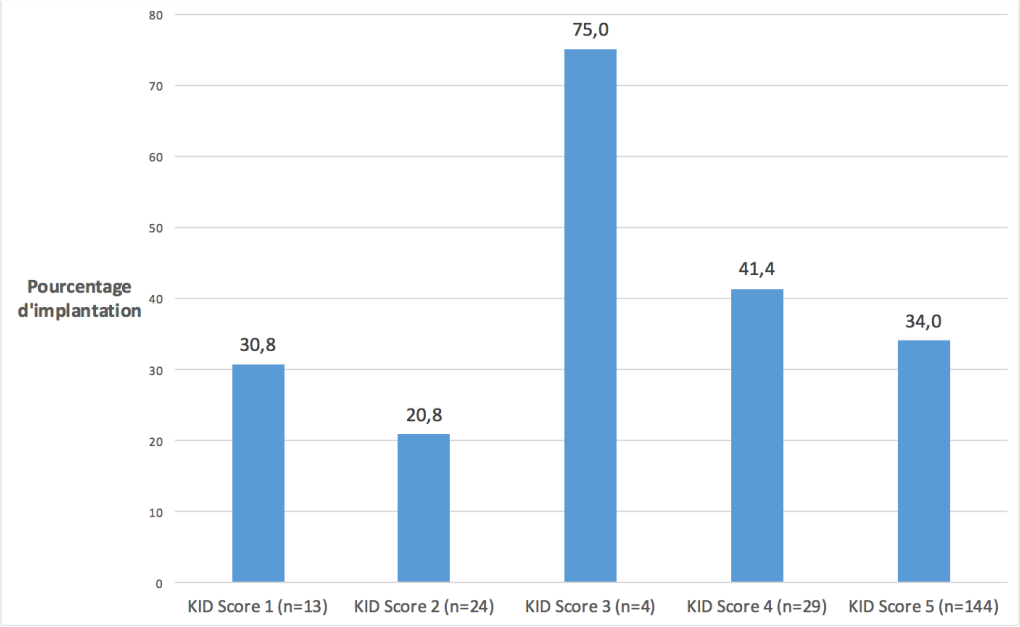

Figure XI : Pourcentage d'implantation des embryons en fonction du KID Score™ Day 3 (n = 214).

Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différents pourcentages observés en utilisant le test du χ^2 ($p > 0,05$).

KID Score ™ Day 5

214 embryons ont été inclus dans l'étude du KID Score™ Day 5. L'association entre le KID Score™ Day 5 et les pourcentages d'implantation des embryons transférés à J5 est présentée dans la figure XII.

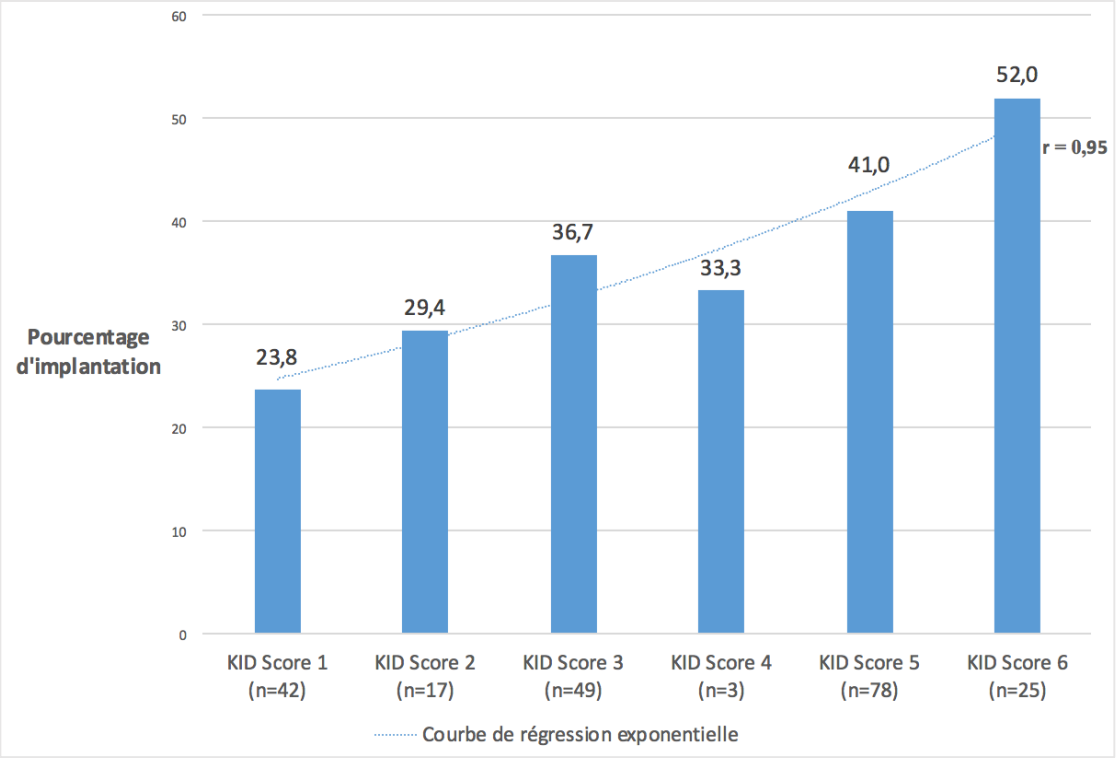

Figure XII : Pourcentage d'implantation des embryons en fonction du KID Score™ Day 5 (n = 214).

Nous observons une forte corrélation entre le KID Score™ Day 5 et les pourcentages d'implantation ($r = 0,95$; $p = 0,004$). Néanmoins, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différents pourcentages observés ($p > 0,05$), à l'exception du pourcentage d'implantation obtenu dans le groupe du KID Score 6 qui est significativement plus élevé que le pourcentage d'implantation obtenu dans le groupe du KID Score 1 ($p = 0,0188$). Nous remarquons également que le nombre d'embryons inclus dans le KID Score 4 est faible ($n = 3$) comparé aux autres groupes.

Le KID Score™ Day 5 n'a pas fait l'objet de publication à ce jour. Nous n'avons donc pas pu comparer nos résultats avec ceux obtenus par d'autres équipes.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la concordance entre l'embryon choisi pour le transfert par le biologiste de la reproduction et l'embryon ayant le KID Score™ Day 5 le plus élevé dans la cohorte embryonnaire.
Nous avons donc analysé pour chaque transfert si l'embryon possédant le meilleur potentiel d'implantation selon le KID Score™ Day 5 a été choisi par le biologiste de la reproduction ou non. Si l'algorithme attribuait le même score à plusieurs embryons et si le biologiste de la reproduction choisissait l'un d'eux, ce choix a été analysé comme concordant. Lorsqu'il n'y avait qu'un seul embryon disponible pour le transfert, celui-ci n'a pas été inclus dans cette analyse.
Le pourcentage de concordance entre le choix du biologiste de la reproduction et l'algorithme s'élève à 78 % (n = 93 cycles analysés). Parmi les discordances (n = 20), la majorité (54 %) est due à une différence de score de 1, avec transfert d'un embryon classé 5 par le KID Score™ Day 5 préférentiellement à un embryon ayant un score égal à 6. Ces derniers étaient cependant systématiquement vitrifiés.

DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons testé la validité de deux algorithmes morphocinétiques, l'un prédictif de la blastulation des embryons (KID Score™ Day 3), et l'autre prédictif de l'implantation des embryons (KID Score™ Day 5).

Le KID Score™ Day 3, basé sur des critères morphocinétiques précoces, est significativement associé à la probabilité de blastulation à J5. L'algorithme assigne à chaque embryon un score prédictif du potentiel de blastulation et de qualité embryonnaire.

L'étude du KID Score™ Day 5 montre une corrélation positive entre les taux d'implantation et le score attribué par l'algorithme. Néanmoins, notre étude n'a pas permis de mettre en évidence des différences statistiques entre les différents taux d'implantation obtenus. Ces différences non significatives peuvent probablement s'expliquer par des effectifs restreints dans certains groupes.

Intérêt prédictif du KID Score ™ Day 3 sur la blastulation des embryons

Petersen (44) indique que le KID Score™ Day 3, initialement développé pour prédire l'implantation des embryons, peut prédire de manière satisfaisante l'évolution des embryons en blastocystes car le stade blastocyste est un pré requis indispensable avant l'implantation. De plus, l'aire sous courbe de la courbe ROC prédictive de la blastulation des embryons est plus élevée que l'aire sous courbe de la courbe ROC prédictive de l'implantation des embryons. Selon Petersen, cet algorithme pourrait être utilisé dans les cas où il serait difficile, au 3ème jour de développement, de déterminer si la culture embryonnaire doit être prolongée jusqu'au 5ème jour afin d'effectuer un transfert.
Nous nous sommes donc intéressés à l'intérêt prédictif du KID Score™ Day 3 sur la blastulation des embryons.

Notre étude a permis de mettre en évidence des résultats intéressants : les 1067 embryons étudiés ont des taux de blastulation croissants en fonction du score attribué par l'algorithme. Ces pourcentages sont significativement différents les uns des autres à l'exception du pourcentage obtenu dans le groupe KID score 2 qui n'était pas significativement différent des pourcentages de blastulation obtenus dans les groupes KID Score 1 et KID Score 3.
Nos pourcentages de blastulation sont significativement plus élevés que les pourcentages obtenus dans l'étude de Petersen (tableau V). Néanmoins, notre étude est une étude rétrospective monocentrique alors que Petersen a mené une étude multicentrique dans 31 centres d'A.M.P. ayant des conditions de culture différentes les uns des autres. Ceci pourrait expliquer les différences observées. Malgré ces différences, l'algorithme assigne à chaque embryon un score prédictif du potentiel de blastulation et est donc une aide pour le biologiste de la reproduction.

Lorsque nous étudions les pourcentages d'embryons se développant en blastocystes de bonne qualité et donc transférables (expansion ≥ B2 et trophectoderme A ou B) en fonction du score assigné par l'algorithme, nous mettons en évidence des différences significatives entre les différents pourcentages. Les pourcentages de blastulation sont significativement différents entre les groupes KID Score (1,2,3), KID Score 4 et KID Score 5. Le KID Score™ Day 3 est donc aussi prédictif de la probabilité d'obtenir au moins un blastocyste de qualité suffisante pour le transfert embryonnaire (ou la vitrification).

Les résultats de notre étude portant sur l'intérêt prédictif du KID Score™ Day 3 sur la blastulation des embryons sont intéressants car ils confirment la capacité de cet algorithme à potentiellement prédire le futur développement embryonnaire. Une association significative entre le score attribué par l'algorithme et le taux de blastulation à J5 a en effet été mise en évidence.

Pour les centres d'A.M.P. réalisant des transferts au stade blastocyste, cet algorithme permettrait d'informer les couples, au 3ème jour de développement embryonnaire, de la probable réalisation ou absence de transfert. Cet algorithme permettrait également d'optimiser la stratégie de culture embryonnaire, en aidant le biologiste de la reproduction à mieux sélectionner les embryons à garder en culture prolongée. L'optimisation de la sélection embryonnaire permettrait un gain de temps technique (observation et manipulation d'un nombre réduit d'embryons) et financier (baisse de la consommation des milieux de culture, baisse du temps consacré à l'observation embryonnaire). Cet algorithme permettrait également une standardisation des pratiques intra et inter laboratoires. Ces résultats doivent être validés dans un second temps par une étude prospective afin de valider l'intérêt de cet algorithme dans l'optimisation de la culture embryonnaire.

Intérêt prédictif des KID Score ™ Day 3 et Day 5 sur l'implantation des embryons

L'étude des 214 embryons analysés à l'aide du KID Score™ Day 5 a montré une forte corrélation entre le KID Score™ Day 5 et les pourcentages d'implantation obtenus. Néanmoins, les taux d'implantation ne sont pas significativement différents les uns des autres, à l'exception de la comparaison des pourcentages des KID Score 1 et 6. Cependant, ces différences non significatives peuvent s'expliquer par des effectifs restreints dans certains groupes. Une étude prospective, avec calcul préalable du nombre de sujets nécessaires à inclure, permettrait d'augmenter la puissance statistique et d'obtenir probablement des résultats significatifs. Un tel travail serait donc intéressant à réaliser afin de confirmer la tendance observée dans notre étude. Nous pouvons cependant relever la très bonne concordance entre l'embryon choisi pour le transfert par le biologiste de la reproduction et le score attribué par le KID Score™ Day 5.

Le KID Score™ Day 3 a été initialement développé pour prédire l'implantation des embryons transférés au 3ème jour de développement. L'étude du KID Score™ Day 3 n'a pas permis de mettre en évidence un intérêt prédictif de cet algorithme pour prédire l'implantation d'un embryon transféré au 5ème jour de développement. Les pourcentages d'implantation ne sont pas croissants en fonction du score attribué par le KID Score™ Day 3 et ils ne sont pas significativement différents les uns des autres.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Kirkegaard (45) : après analyse rétrospective d'une cohorte embryonnaire à l'aide de l'algorithme de Conaghan (35), prédictif de la blastulation des embryons, Kirkegaard a observé que 50,6 % des embryons ayant donné une grossesse étaient classés comme inutilisables par l'algorithme. Ceci peut s'expliquer en partie par le fait que les embryons présentant un développement morphocinétique anormal peuvent se développer en blastocystes euploïdes (34).

Les algorithmes développés pour prédire les taux de blastulation ne sont donc pas forcément prédictifs des taux d'implantation des embryons et ils ne doivent pas être utilisés pour prédire l'implantation des embryons sans validation préalable.

Le KID Score™ Day 3 n'a pas montré de performances satisfaisantes dans notre étude afin de l'utiliser en routine dans notre centre d'A.M.P. pour prédire l'implantation des embryons transférés à J5. Néanmoins, nous ne nous sommes pas intéressés à l'intérêt prédictif de cet algorithme sur l'implantation des embryons après transfert à J3, ce qui est son indication initiale.

Le KID Score™ Day 5 prend en compte un nombre plus important d'évènements morphocinétiques durant les 5 jours du développement embryonnaire in vitro. Il est donc censé être un algorithme plus robuste que le KID Score™ Day 3. Le KID Score™ Day 5 a montré des résultats intéressants, mettant en évidence une corrélation entre le KID Score™ Day 5 et les taux d'implantation des embryons. Néanmoins, notre étude n'a pas permis de mettre en évidence des différences statistiques entre les différents taux d'implantation obtenus, nécessitant la réalisation d'une future étude prospective.

Intérêt du Time Lapse et des modèles prédictifs

Depuis l'introduction des systèmes Time Lapse dans les laboratoires d'A.M.P., de nombreuses études rétrospectives ont été publiées afin de trouver des marqueurs morphocinétiques prédictifs du potentiel d'implantation des embryons. Après saisie des mots-clés « Time Lapse IVF », 185 publications sont répertoriées sur PubMed. Néanmoins, très peu d'études prospectives randomisées existent à ce jour.

Les essais randomisés récents s'intéressant à l'intérêt de la culture et de la sélection embryonnaire par les systèmes Time Lapse montrent des résultats hétérogènes (38) (46). Une méta analyse de Chen (47) n'a retrouvé aucune différence sur les taux de grossesses évolutives. Néanmoins, la plus récente méta analyse (juillet 2017) est favorable aux systèmes Time Lapse (48). Ils permettent d'obtenir de meilleurs taux de grossesses cliniques (51,0 %) comparés à l'évaluation classique et statique des embryons (39,9 %), ainsi qu'un taux de fausses couches précoces inférieur (15,3 % versus 21,3 %).

Les systèmes Time Lapse ont comme avantages indéniables l'amélioration des conditions de culture par rapport à un incubateur standard et la détection des évènements anormaux du développement embryonnaire, non détectables en microscopie classique. Les systèmes Time Lapse permettent également une flexibilité dans l'organisation du laboratoire, le développement embryonnaire pouvant être visionné en différé.

L'un des principaux problèmes des algorithmes prédictifs développés ces dernières années, est le manque de standardisation du point de départ de l'analyse des images. La plupart des algorithmes utilisent l'heure moyenne d'injection de la cohorte ovocytaire pour définir le début de l'analyse. Or, en F.I.V. conventionnelle, l'horaire précis de la fécondation est impossible à déterminer. En I.C.S.I., une différence peut exister entre l'heure d'injection du premier et du dernier ovocyte. Cette différence est d'autant plus importante que l'I.C.S.I. est compliquée à réaliser (problème matériel, cryptozoospermie, réalisation d'un test H.O.S.T…). Des

propositions ont été effectuées afin de standardiser le point de départ de l'analyse, comme l'apparition des 2 pronuclei (49) ou l'identification de la première division cellulaire (50).

La standardisation des annotations est également un autre problème malgré une proposition de consensus (51). Ce manque de standardisation peut expliquer en partie les différences obtenues lors des validations externes des algorithmes prédictifs.

Mölder a publié des travaux préliminaires en 2015 sur un système d'annotation des embryons semi automatisé développé pour l'Embryoscope® (52). Ce logiciel est capable de détecter et d'annoter les divisions cellulaires, la compaction et la blastulation d'un embryon, avec des performances néanmoins limitées. Le C.H.U. de Nantes développe actuellement un système d'annotation automatique des embryons sur l'Embryoscope®. Le développement de systèmes d'annotation automatiques apporterait une standardisation des pratiques intra et inter laboratoires et également une amélioration du niveau de preuves des études multicentriques en limitant la variabilité inter opérateur et inter laboratoire.

Actuellement, seul le Geri® est équipé d'un système d'annotation automatisé de quelques évènements morphocinétiques précoces. L'algorithme utilisé par le logiciel du Geri® est l'ancien algorithme Eeva®. Néanmoins, son intérêt clinique n'a pas été démontré : Kieslinger (53) n'a pas retrouvé de différence significative entre les taux de grossesses cliniques du groupe Time Lapse et du groupe témoin. De plus, le logiciel d'annotation automatique doit encore être amélioré. Une récente étude de Kaser (54) a mis en évidence des discordances entre les annotations manuelles effectuées par des biologistes de la reproduction expérimentés et les annotations effectuées par le logiciel informatique. Après application de l'algorithme prédictif, 30 % des scores attribués par l'algorithme étaient discordants entre l'annotation manuelle et l'annotation automatique.

Depuis la publication du premier algorithme morphocinétique par Meseguer en 2011, basé sur 3 paramètres précoces (23), de nombreuses études morphocinétiques ont été menées afin de trouver un algorithme applicable en routine, et capable de détecter les risques d'aneuploïdie (30) (31), de prédire la formation de blastocystes (55) (56) ou de prédire les taux d'implantation (37) (44). La majorité de ces algorithmes ont été développés avec une base de données monocentrique, et peu d'entre eux ont été testés dans d'autres centres d'A.M.P. (40) (41) ou dans des essais randomisés (38).

Les algorithmes conçus pour prédire les taux de blastulation sont généralement plus robustes que les algorithmes conçus pour prédire les taux d'implantation. En effet, lors de la conception d'un algorithme prédictif de la blastulation des embryons, il est relativement facile de recueillir les données. L'obtention des données est plus difficile pour construire des algorithmes prédictifs des taux d'implantation ou des taux de naissances vivantes. Il peut être difficile d'aboutir à l'exhaustivité des données (perdus de vue, échographie et/ou accouchement effectués dans un autre hôpital, etc…). De plus, l'implantation est un phénomène extrêmement multifactoriel et le nombre de variables influençant le point de mesure final est plus important que pour la blastulation. L'utérus peut ne pas être réceptif à l'implantation de l'embryon lors du transfert, indépendamment du potentiel d'implantation de l'embryon.
Il existe également des biais lors de l'acquisition des données : l'ensemble des embryons présentant un clivage sont inclus pour étudier les taux de blastulation alors que seuls les embryons transférés sont retenus pour étudier les taux d'implantation. Une sélection plus stricte des embryons est donc réalisée lors de la construction d'un algorithme prédictif des taux d'implantation comparée à un algorithme prédictif des taux de blastulation. Or ces algorithmes sont ensuite appliqués à une population hétérogène d'embryons non sélectionnés.

Néanmoins, les algorithmes développés pour prédire les taux de blastulation ne sont pas forcément prédictifs des taux d'implantation des embryons (45). Même si le transfert embryonnaire est ressenti par le couple comme l'aboutissement du parcours en A.M.P., il n'est qu'une étape de ce parcours. L'A.M.P. a comme principal

objectif de permettre à des couples infertiles d'avoir des enfants, aussi le critère principal d'un algorithme devrait donc être le taux de naissances vivantes. Utiliser le taux de blastulation comme critère principal est cliniquement moins pertinent.

Le pourcentage d'embryons inclus dans le score le plus élevé permet de distinguer deux types d'algorithmes : les algorithmes de sélection et les algorithmes de désélection.

- Les algorithmes de sélection attribuent le score le plus élevé à un faible pourcentage d'embryons. Certains embryons ayant une bonne probabilité de se développer en blastocystes ou de s'implanter ne vont pas être sélectionnés par ces algorithmes. Par contre, les embryons sélectionnés ont des taux élevés de blastulation ou d'implantation. Ces algorithmes ont donc une bonne spécificité.

- Les algorithmes de désélection, au contraire, attribuent le score le plus élevé à un nombre plus important d'embryons. Ces algorithmes sont capables de relativement bien écarter les embryons qui n'atteindront pas le stade blastocyste ou qui ne s'implanteront pas. En revanche, des embryons présentant une faible probabilité de développement peuvent être sélectionnés. Ces algorithmes présentent donc une meilleure sensibilité que les algorithmes de sélection mais leur spécificité est réciproquement diminuée.

Généralement, le dernier algorithme prédictif publié présente les meilleurs pourcentages de blastulation ou d'implantation embryonnaire. Ceci peut s'expliquer par l'accumulation des connaissances disponibles sur les systèmes Time Lapse. Cependant, nous devons être vigilants lorsque nous comparons différents algorithmes entre eux. Les algorithmes sont-ils prédictifs de l'évolution des embryons en blastocystes ou de l'implantation des embryons ? Comment l'implantation des embryons est-elle définie (βhCG > 10 UI/L, présence d'un sac gestationnel…) ?
Seule l'application de différents algorithmes sur une même cohorte embryonnaire permet de les comparer.

En comparant sur une même cohorte embryonnaire (44) les algorithmes de Liu (37) et de Petersen (44), qui présentent des performances équivalentes pour prédire la formation de blastocyste, l'algorithme de Liu attribue le score A+ à 5,8 % des embryons et le score A à 17 % des embryons (les taux de blastulation dans ces groupes sont de respectivement 72,7 % et de 71 %). Avec l'algorithme de Petersen, 62,7 % des embryons sont classés dans les groupes 4 et 5 (55,7 % dans notre étude) dont 41,6 % dans le groupe 5 (37,0 % dans notre étude). Les scores maximaux sont donc attribués à un pourcentage relativement élevé d'embryons. Le KID Score™ Day 3 est donc un algorithme de désélection. Il a une approche plus conservatrice et rejette moins d'embryons que l'algorithme de Liu. Le KID Score™ Day 3 sélectionne les embryons qui peuvent potentiellement se développer en blastocystes alors que l'algorithme de Liu sélectionne les embryons ayant la meilleure probabilité de se développer en blastocyste.

Les équipes s'intéressant aux algorithmes prédictifs n'ont jusqu'à présent pas pris en compte les différents biais existants (composition des milieux de culture, âge des patientes, protocoles et traitements de stimulation...). Kirkegaard (57) a publié une étude très intéressante en 2016, mettant en évidence qu'une partie des différences morphocinétiques observées dans les différentes cohortes embryonnaires peuvent s'expliquer par des facteurs inhérents aux couples de patients et au cycle de stimulation (âge maternel, I.M.C., dose de F.S.H.). Les différences observées sont probablement dues à une combinaison de plusieurs facteurs car aucun des facteurs analysés individuellement n'a montré d'influence sur le développement embryonnaire.

La morphocinétique embryonnaire est donc influencée par l'origine de l'embryon, aussi cette origine doit être considérée comme un biais potentiel dans les études. De plus, les résultats de Kirkegaard indiquent que les cinétiques de développement de plusieurs embryons d'une même cohorte sont davantage similaires que les cinétiques de développement d'embryons provenant de cohortes différentes. Les embryons d'une même cohorte ne devraient donc pas être considérés comme statistiquement indépendants et il y a un risque élevé d'analyses statistiques erronées. Des essais randomisés prospectifs sont donc nécessaires afin d'évaluer l'intérêt de la morphocinétique embryonnaire pour améliorer la sélection embryonnaire.

De plus, les algorithmes prédictifs publiés ont été développés dans des conditions définies d'un centre d'A.M.P. et sont apparemment moins pertinents dans d'autres centres (40) (58). Aussi, avant de mettre en place en routine un algorithme publié, le biologiste de la reproduction doit faire preuve de prudence et réaliser une validation interne de cet algorithme afin de confirmer ses performances et éventuellement l'adapter aux conditions spécifiques du centre. Néanmoins, il est important de garder à l'esprit que ces algorithmes ne seront jamais fiables à 100 % et qu'ils ne sont qu'un outil d'aide à la disposition des biologistes de la reproduction.
Nos résultats obtenus avec le KID Score™ Day 5 confirment cette nécessité de validation interne avant de déterminer la place réelle de cet outil en routine.

Actuellement, la morphologie embryonnaire (taille des blastomères, multinucléation, fragmentation…) est un critère d'exclusion initial dans plusieurs algorithmes publiés quand elle est très péjorative. De futurs algorithmes, intégrant cette morphologie, permettraient probablement d'augmenter la sensibilité et la spécificité de ces modèles prédictifs et permettraient donc au biologiste de la reproduction de prendre des décisions mieux documentées. Conaghan (35) a en effet montré que la combinaison de la morphologie embryonnaire avec son algorithme prédictif augmentait l'identification des embryons atteignant le stade blastocyste et réduisait également les variabilités inter individuelles. Néanmoins, une récente étude prospective de Kaser (59) n'a pas permis de mettre en évidence une augmentation du taux de grossesses cliniques en associant la morphologie embryonnaire et l'algorithme prédictif Eeva®.

CONCLUSION

Le KID Score™ Day 3 et le KID Score™ Day 5 sont des algorithmes prédictifs respectivement de la blastulation et de l'implantation des embryons. Ils ont été développés à l'aide d'une base de données multicentrique, aussi, ces algorithmes devraient être théoriquement directement applicables dans n'importe quel centre d'A.M.P. possédant un Embryoscope®, sans validation interne préalable.

La validation externe du KID Score™ Day 3, prédictif du potentiel de blastulation des embryons, a montré des résultats très intéressants. L'algorithme assigne à chaque embryon un score prédictif du potentiel de blastulation et de qualité embryonnaire. Il est donc une aide pour le biologiste de la reproduction pour anticiper au mieux le futur développement embryonnaire et optimiser le choix de la stratégie de transfert embryonnaire. Une étude prospective est nécessaire afin de valider l'intérêt de cet algorithme dans l'optimisation de la culture embryonnaire et le choix de la stratégie de culture embryonnaire.

La validation externe du KID Score™ Day 5 dans notre centre d'A.M.P. a mis en évidence une corrélation entre le KID Score™ Day 5 et les taux d'implantation. Néanmoins, notre étude n'a pas permis de mettre en évidence des différences statistiques entre les différents taux d'implantation obtenus. Une étude prospective, avec calcul préalable du nombre de sujets nécessaires à inclure, permettrait d'augmenter la puissance statistique afin de confirmer la tendance observée dans notre étude.

La mise en place d'un algorithme publié dans un centre d'A.M.P. doit s'effectuer après une validation interne afin de valider les performances de l'algorithme dans les conditions spécifiques du centre. De nouveaux algorithmes intégrant la morphologie embryonnaire et le développement de l'annotation automatisée des embryons permettront d'augmenter la sensibilité et la spécificité de ces modèles prédictifs.

BIBLIOGRAPHIE

1. Larousse Médical.
2. LOI n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique.
3. Rapport médical et scientifique de l'assistance médicale à la procréation et de la génétique humaines en France. 2015.
4. Gardner DK, Schoolcraft, WB. In Vitro Culture of Human Blastocyst. Towards Reproductive Certainty: Infertility and Genetics Beyond. Janson R, Mortimer D. 1999;378‑88.
5. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. Human Reproduction. 1999;(14):318‑23.
6. ALPHA/ESHRE. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Hum Reprod. 1 juin 2011;26(6):1270‑83.
7. Paternot G, Wetsels AM, Thonon F, Vansteenbrugge A, Willemen D, Devroe J, et al. Intra- and interobserver analysis in the morphological assessment of early stage embryos during an IVF procedure: a multicentre study. Reprod Biol Endocrinol RBE. 15 sept 2011;9:127.
8. Montag M, Liebenthron J, Köster M. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? Placenta. 1 sept 2011;32:S252‑6.
9. Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. Fertil Steril. 1 déc 2001;76(6):1157‑67.
10. Ahlström A, Westin C, Reismer E, Wikland M, Hardarson T. Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. Hum Reprod. 1 déc 2011;26(12):3289‑96.
11. Van den Abbeel E, Balaban B, Ziebe S, Lundin K, Cuesta MJG, Klein BM, et al. Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer. Reprod Biomed Online. 1 oct 2013;27(4):353‑61.
12. Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. Fertil Steril. 2010;94(5):1700‑6.

13. Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft WB, Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. Hum Reprod. 1 nov 2008;23(11):2596‑608.

14. Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, et al. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. Hum Reprod. 1 déc 2004;19(12):2849‑58.

15. Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, et al. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. Hum Reprod. 1 juin 2014;29(6):1173‑81.

16. van Loendersloot L, van Wely M, van der Veen F, Bossuyt P, Repping S. Selection of embryos for transfer in IVF: ranking embryos based on their implantation potential using morphological scoring. Reprod Biomed Online. août 2014;29(2):222‑30.

17. McLernon DJ, Harrild K, Bergh C, Davies MJ, Neubourg D de, Dumoulin JCM, et al. Clinical effectiveness of elective single versus double embryo transfer: meta-analysis of individual patient data from randomised trials. The BMJ. 2010;341.

18. Valbuena D, Martin J, de Pablo JL, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. Fertil Steril. 76(5):962‑8.

19. Fanchin R, Frydman R. Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. Human Reproduction. 2001;

20. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. Nature. 31 mars 1988;332(6163):459‑61.

21. Glujovsky D, Farquhar C, Quinteiro Retamar AM, Alvarez Sedo CR, Blake D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. Cochrane Database Syst Rev. 2016;(6).

22. Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, Devroey P. In Vitro Fertilization with Single Blastocyst-Stage versus Single Cleavage-Stage Embryos. N Engl J Med. 16 mars 2006;354(11):1139‑46.

23. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The

use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. Hum Reprod Oxf Engl. oct 2011;26(10):2658‑71.

24. Aparicio B, Cruz M, Meseguer M. Is morphokinetic analysis the answer? Reprod Biomed Online. déc 2013;27(6):654‑63.

25. Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escribá M-J, et al. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. Fertil Steril. déc 2012;98(6):1458‑63.

26. Liu Y, Chapple V, Roberts P, Matson P. Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the Embryoscope time-lapse video system. Fertil Steril. nov 2014;102(5):1295‑1300.e2.

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

28. Armstrong S, Arroll N, Cree LM, Jordan V, Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. Cochrane Database Syst Rev. 2015;(2).

29. Minasi MG, Colasante A, Riccio T, Ruberti A, Casciani V, Scarselli F, et al. Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study. Hum Reprod Oxf Engl. oct 2016;31(10):2245‑54.

30. Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CFL. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. Reprod Biomed Online. 1 mai 2013;26(5):477‑85.

31. Basile N, Nogales M del C, Bronet F, Florensa M, Riqueiros M, Rodrigo L, et al. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. Fertil Steril. 1 mars 2014;101(3):699‑704.e1.

32. Kramer YG, Kofinas JD, Melzer K, Noyes N, McCaffrey C, Buldo-Licciardi J, et al. Assessing morphokinetic parameters via time lapse microscopy (TLM) to predict euploidy: are aneuploidy risk classification models universal? J Assist Reprod Genet. 1 sept 2014;31(9):1231‑42.

33. Rienzi L, Capalbo A, Stoppa M, Romano S, Maggiulli R, Albricci L, et al. No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort

study. Reprod Biomed Online. janv 2015;30(1):57‑66.

34. Lagalla C, Tarozzi N, Sciajno R, Wells D, Di Santo M, Nadalini M, et al. Embryos with morphokinetic abnormalities may develop into euploid blastocysts. Reprod Biomed Online. févr 2017;34(2):137‑46.

35. Conaghan J, Chen AA, Willman SP, Ivani K, Chenette PE, Boostanfar R, et al. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. Fertil Steril. 2013;100(2):412‑419.e5.

36. Basile N, Vime P, Florensa M, Aparicio Ruiz B, García Velasco JA, Remohí J, et al. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. Hum Reprod Oxf Engl. févr 2015;30(2):276‑83.

37. Liu Y, Chapple V, Feenan K, Roberts P, Matson P. Time-lapse deselection model for human day 3 in vitro fertilization embryos: the combination of qualitative and quantitative measures of embryo growth. Fertil Steril. mars 2016;105(3):656‑662.e1.

38. Rubio I, Galán A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J, et al. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. Fertil Steril. 2014;102(5):1287‑1294.e5.

39. Adamson GD, Abusief ME, Palao L, Witmer J, Palao LM, Gvakharia M. Improved implantation rates of day 3 embryo transfers with the use of an automated time-lapse–enabled test to aid in embryo selection. Fertil Steril. 2016;105(2):369‑375.e6.

40. Fréour T, Le Fleuter N, Lammers J, Splingart C, Reignier A, Barrière P. External validation of a time-lapse prediction model. Fertil Steril. avr 2015;103(4):917‑22.

41. VerMilyea MD, Tan L, Anthony JT, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, et al. Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: A blinded, multi-centre study. Reprod Biomed Online. déc 2014;29(6):729‑36.

42. Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media—a sibling

oocyte study. J Assist Reprod Genet. sept 2012;29(9):891‑900.

43. Kazdar N, Brugnon F, Bouche C, Jouve G, Veau S, Drapier H, et al. Comparison of human embryomorphokinetic parameters in sequential or global culture media. Ann Biol Clin (Paris). 1 août 2017;75(4):403‑10.

44. Petersen BM, Boel M, Montag M, Gardner DK. Development of a generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on Day 3. Hum Reprod Oxf Engl. oct 2016;31(10):2231‑44.

45. Kirkegaard K, Campbell A, Agerholm I, Bentin-Ley U, Gabrielsen A, Kirk J, et al. Limitations of a time-lapse blastocyst prediction model: a large multicentre outcome analysis. Reprod Biomed Online. 1 août 2014;29(2):156‑8.

46. Goodman LR, Goldberg J, Falcone T, Austin C, Desai N. Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. Fertil Steril. févr 2016;105(2):275‑285.e10.

47. Chen M, Wei S, Hu J, Yuan J, Liu F. Does time-lapse imaging have favorable results for embryo incubation and selection compared with conventional methods in clinical in vitro fertilization? A meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. PLoS ONE. 1 juin 2017;12(6).

48. Pribenszky C, Nilselid A-M, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. Reprod Biomed Online. 10 juill 2017;0(0).

49. Liu Y, Chapple V, Feenan K, Roberts P, Matson P. Time-lapse videography of human embryos: Using pronuclear fading rather than insemination in IVF and ICSI cycles removes inconsistencies in time to reach early cleavage milestones. Reprod Biol. 1 juin 2015;15(2):122‑5.

50. Freour T, Basile N, Barriere P, Meseguer M. Systematic review on clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring. Hum Reprod Update. 1 janv 2015;21(1):153‑4.

51. Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, Aguilar J, Chamayou S, Esbert M, et al. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. Hum Reprod. 1 déc 2014;29(12):2650‑60.

52. Mölder A, Drury S, Costen N, Hartshorne GM, Czanner S. Semiautomated analysis of embryoscope images: Using localized variance of image intensity to detect embryo developmental stages. Cytometry A. 1 févr 2015;87(2):119‑28.

53. Kieslinger DC, De Gheselle S, Lambalk CB, De Sutter P, Kostelijk EH, Twisk JWR, et al. Embryo selection using time-lapse analysis (Early Embryo Viability Assessment) in conjunction with standard morphology: a prospective two-center pilot study. Hum Reprod. 21 nov 2016;31(11):2450‑7.

54. Kaser DJ, Farland LV, Missmer SA, Racowsky C. Prospective study of automated versus manual annotation of early time-lapse markers in the human preimplantation embryo. Hum Reprod. 1 août 2017;32(8):1604‑11.

55. Milewski R, Kuć P, Kuczyńska A, Stankiewicz B, Łukaszuk K, Kuczyński W. A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. J Assist Reprod Genet. avr 2015;32(4):571‑9.

56. Motato Y, de los Santos MJ, Escriba MJ, Ruiz BA, Remohí J, Meseguer M. Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system. Fertil Steril. févr 2016;105(2):376‑384.e9.

57. Kirkegaard K, Sundvall L, Erlandsen M, Hindkjær JJ, Knudsen UB, Ingerslev HJ. Timing of human preimplantation embryonic development is confounded by embryo origin. Hum Reprod Oxf Engl. févr 2016;31(2):324‑31.

58. Barrie A, Homburg R, McDowell G, Brown J, Kingsland C, Troup S. Examining the efficacy of six published time-lapse imaging embryo selection algorithms to predict implantation to demonstrate the need for the development of specific, in-house morphokinetic selection algorithms. Fertil Steril. 6 janv 2017;

59. Kaser DJ, Bormann CL, Missmer SA, Farland LV, Ginsburg ES, Racowsky C. A pilot randomized controlled trial of Day 3 single embryo transfer with adjunctive time-lapse selection versus Day 5 single embryo transfer with or without adjunctive time-lapse selection. Hum Reprod. 1 août 2017;32(8):1598‑603.

Vu, le Président du jury,

Vu, le Directeur de thèse,

Vu, le Directeur de l'UFR,

UNIVERSITÉ DE NANTES **Année de la soutenance : 2017**

Nom - Prénom : GIRARD Jean-Maxime

Titre de la thèse :

Evaluation de l'intérêt prédictif du KID Score™ Day 3 et du KID Score™ Day 5 en fécondation in vitro.

Résumé de la thèse :

Différentes équipes se sont intéressées à l'évaluation des algorithmes morphocinétiques prédictifs de l'implantation ou de la blastulation des embryons. La plupart de ces études ont montré des résultats modestes, notamment dus à des conditions de culture différentes entre les laboratoires et aux limites de ces modèles développés sur des populations restreintes et monocentriques.

Ce travail a pour objectif principal la validation externe de deux modèles prédictifs proposés par la société Vitrolife® pour l'Embryoscope® : le KID Score™ Day 3 pour la prédiction de la blastulation des embryons et le KID Score™ Day 5 pour la prédiction de l'implantation des embryons.

La validation externe du KID Score™ Day 3 a montré des résultats intéressants. L'algorithme assigne à chaque embryon un score prédictif du potentiel de blastulation et de qualité embryonnaire.
La validation externe du KID Score™ Day 5 dans notre centre d'A.M.P. a mis en évidence une corrélation entre les taux d'implantation des embryons et le score attribué par cet algorithme.

La mise en place d'un algorithme publié dans un centre d'A.M.P. doit s'effectuer après une validation interne afin de valider les performances de l'algorithme dans les conditions spécifiques du centre. De nouveaux algorithmes intégrant la morphologie embryonnaire et le développement de l'annotation automatisée permettront d'augmenter la sensibilité et la spécificité des modèles prédictifs.

MOTS CLÉS : AMP - Time Lapse - FIV - Embryon

JURY

PRÉSIDENT : **Madame le Professeur Virginie FERRE**

ASSESSEURS : **Monsieur le Professeur Paul BARRIERE**
Monsieur le Professeur Thomas FREOUR
Madame le Professeur Célia RAVEL
Madame le Docteur Sophie MIRALLIE

Adresse de l'auteur : **GIRARD Jean-Maxime**
8 impasse des Saules
85280 LA FERRIERE