

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 142789 9

ANNEE 2005

THESE N°

154/1/1

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

**Obtenu après soutenance du**

**MEMOIRE  
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale**

**INTERET DE L' INSEMINATION COURTE DES  
GAMETES EN FIV CLASSIQUE : ETUDE  
PROSPECTIVE RANDOMISEE**

Présentée et soutenue publiquement le 19 octobre 2005

Par

**Khaled POCATE-CHERIET**

Né le 24 avril 1976 à Ploiesti (Roumanie)

**Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Jean Philippe WOLF**

**MEMBRES DU JURY**

Madame le Professeur Catherine YARDIN  
Monsieur le Professeur Yves AUBARD  
Madame le Professeur Sylvie ROGEZ  
Monsieur le Professeur Jean Philippe WOLF  
Madame le Docteur Sophie PAULHAC  
Monsieur le Docteur Pascal PIVER  
Monsieur le Docteur Christophe SIFER

Président  
Juge  
Juge  
Juge  
Membre invité  
Membre invité  
Membre invité

# UNIVERSITE DE LIMOGES

## FACULTE DE MEDECINE

### DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude

### ASSESEURS:

Monsieur le Professeur LASKAR Marc  
Monsieur le Professeur VALLEIX Denis  
Monsieur le Professeur COGNE Michel

### SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

ROCHE Doriane

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

\* C.S = Chef de Service

ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul * (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Jean-Luc	CHIRURGIE INFANTILE
ALDIGIER Jean-Claude (C.S)	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX Françoise (C.S)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
AUBARD Yves (C.S)	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
BARTHE Dominique	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGENETIQUE
BEDANE Christophe (C.S)	DERMATOLOGIE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François (C.S)	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie	DERMATOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
BOUTROS-TONI Fernand	BIOSTATISTIQUE ET INFORMATIQUE MEDICALE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
CI-AVERE Pierre (C.S)	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre (C.S)	PSYCHIATRIE ADULTES
COGNE Michel (C.S)	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre	UROLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
CUBERTAFOND Pierre	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S)	PEDIATRIE
DENIS François (C.S)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE-HYGIENE
DESCOTTES Bernard (C.S)	ANATOMIE
DUDOIGNON Pierre (C.S)	REEDUCATION FONCTIONNELLE
DUMAS Jean-Philippe	UROLOGIE
DUMAS Michel (SUR)	NEUROLOGIE
DUMONT Daniel (C.S)	MEDECINE DU TRAVAIL
DUPUY Jean-Paul (SUR)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
FEISS Pierre (C.S)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
FEUILLARD Jean (C.S)	HEMATOLOGIE
GAINANT Alain (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
GASTINNE Hervé (C.S)	REANIMATION MEDICALE
JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François (C.S)	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LEGER Jean-Marie (SUR)	PSYCHIATRIE D'ADULTES
LEROUX-ROBERT Claude (SUR)	NEPHROLOGIE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE
MABIT Christian	ANATOMIE-CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE
MAUBON Antoine (C.S)	RADIOLOGIE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MENIER Robert (SUR)	PHYSIOLOGIE
MERLE Louis	PHARMACOLOGIE
MOREAU Jean-Jacques (C.S)	NEUROCHIRURGIE





## REMERCIEMENTS

**A Madame le Professeur Yardin**, Professeur des Universités d'Histologie, Praticien Hospitalier, Chef de service, de nous faire l'honneur de présider ce jury. Nous tenons à lui exprimer toute notre reconnaissance.

**A Monsieur le Professeur Aubard**, Professeur des Universités de Gynécologie-Obstétrique, Chirurgien des Hôpitaux, Chef de service, d'avoir accepté de juger ce travail et de nous faire l'honneur de participer au jury de cette thèse. Je tiens à lui témoigner toute ma gratitude pour m'avoir permis de concilier mon stage clinique et mes activités de recherche.

**A Madame le Professeur Rogez**, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie à la Faculté de Pharmacie, Praticien Hospitalier, d'avoir accepté de juger ce travail et de nous faire l'honneur de participer au jury de cette thèse.

**A Monsieur le Professeur Wolf**, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Chef de service, pour m'avoir encadré au cours de ce travail. Je tiens à le remercier pour son enseignement, sa disponibilité et sa générosité ainsi que pour son aide et ses précieux conseils. Travailler à ses côtés a été un réel plaisir. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon respect.

**A Madame le Docteur Paulhac**, Praticien Hospitalier, d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance et la remercier de m'avoir accueilli au laboratoire me permettant ainsi de connaître cette discipline et son enseignement.

**A Monsieur le Docteur Piver**, Praticien Hospitalier, d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Je tiens à le remercier de m'avoir fait participer aux activités de recherche du service de Gynécologie-Obstétrique.

**A Monsieur le Docteur Sifer**, Praticien Hospitalier, d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et d'avoir contribué à la réalisation de ce travail. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance et tout mon respect pour sa confiance et pour m'avoir autant appris sur le plan théorique et pratique. Sa générosité, sa disponibilité ainsi que ses conseils et son aide m'ont été précieux. Encore merci pour tout.



**Nous tenons à remercier tous ceux qui ont collaboré à la réalisation de ce travail :**

Monsieur le Docteur Porcher, Praticien Hospitalier, et son équipe pour leur aide "statistique".

Monsieur le Professeur Hughes et son équipe pour leur disponibilité.

Toute l'équipe du laboratoire de Biologie de la Reproduction de l'Hôpital Jean Verdier :  
Madame le Docteur Martin-Pont, Bouchra, Katarina, Peggy, Sandrine, Joël, Ilina, Catherine  
pour leur accueil, leur gentillesse et leur disponibilité ainsi que pour leur collaboration.

**Je tiens également à remercier celles et ceux qui ont contribué à ma formation et ceux avec qui j'ai travaillé tout au long de ces années :**

Monsieur le Docteur Pech pour son accueil, sa disponibilité et son enseignement. Je tiens à le remercier de m'avoir fait connaître et apprécier la biologie de la reproduction.

Monsieur le Docteur Terro pour m'avoir encadré et aidé durant mes activités de recherche ainsi que pour son aide précieuse en informatique et accessoirement, en gastronomie.

L'ensemble de l'équipe de Cytogénétique du CHU de Limoges pour son accueil et sa gentillesse.

L'ensemble de l'équipe de PMA du CHU de Limoges : Malvina, Geneviève, Marie-Claude et Sylvie pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Je tiens à remercier particulièrement Marie-Claire de m'avoir tant appris et d'avoir toujours été de bon conseil. Travailler à ses côtés a été un grand plaisir. Je lui témoigne toute ma reconnaissance et mon amitié.

Tous les membres des laboratoires d'hématologie, de biochimie, de bactériologie-virologie, d'immunologie et de parasitologie du CHU de Limoges pour leur accueil et leur gentillesse. Je remercie les biologistes de ces services pour leur enseignement attentif et leur disponibilité au cours de mon internat.

Toute l'équipe du laboratoire de Cytogénétique de l'Hôpital Jean Verdier : Madame le Professeur Benzacken, Madame le Docteur Pipiras, Madame le Docteur Malan, Evelyne, Jean, Céline et Magalie, pour leur gentillesse et leur accueil.

Monsieur le Docteur Poncelet, pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses précieux conseils. Il m'a beaucoup appris sur le versant clinique de la discipline. Je lui témoigne toute ma reconnaissance et mon respect.

Mes co-internes de Toulouse, Bordeaux, Paris et Limoges pour leur soutien, leur complicité et leur amitié. A Sylvie et Sébastien pour leur aide et leur amitié. A Armelle pour son aide.



*A Philippe, mon ami très cher.*

*A Emmanuelle, Myriam, Meryll, David, Moncef, David et François.*

*A ma famille avec toute mon affection, je vous dédie ce travail.*

*A ma sœur Sarah, merci pour tout.*



## SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	4
SOMMAIRE.....	9
ABREVIATIONS.....	11
<b>1<sup>ère</sup> PARTIE : GENERALITES .....</b>	<b>13</b>
<b>I. PHYSIOLOGIE DE LA FECONDATION HUMAINE .....</b>	<b>14</b>
1. INTRODUCTION.....	14
2. LES ACTEURS DE LA FECONDATION.....	14
3. LES ETAPES DE LA FECONDATION .....	16
4. ACTIVATION DE L'OVOCYTE.....	24
5. FORMATION, DEVELOPPEMENT ET MIGRATION DES PRONOUAUX ..	26
<b>II. PREMIERE SEMAINE DE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE</b> .....	<b>29</b>
1. LA COMPACTION DE LA MORULA .....	30
2. FORMATION DU BLASTOCYSTE.....	32
3. EXPANSION DU BLASTOCYSTE.....	32
4. MIGRATION DE L'EMBRYON.....	33
<b>III. LA FECONDATION IN VITRO : ASPECTS CLINIQUES ET</b> <b>TECHNIQUES.....</b>	<b>34</b>
1. INTRODUCTION.....	34
2. ASPECTS CLINIQUES .....	35
3. ASPECTS TECHNIQUES : DEROULEMENT D'UNE FIV AU	
LABORATOIRE.....	37
<b>IV. LE STRESS OXYDATIF .....</b>	<b>43</b>
1. INTRODUCTION.....	43
2. RADICAUX LIBRES ET LIEUX DE PRODUCTION .....	44
3. ROLE DU STRESS OXYDATIF DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA	
REPRODUCTION.....	47

V. RACCOURCISSEMENT DU TEMPS D' INSEMINATION DES GAMETES EN FIV : REVUE DE LA LITTERATURE.....	51
VI. QUALITE EMBRYONNAIRE ET EVOLUTION VERS LE TRANSFERT D' EMBRYON UNIQUE.....	53
1. INTRODUCTION.....	53
2. COMPLICATIONS DES GROSSESSES MULTIPLES.....	54
VII. EVALUATION DE LA QUALITE EMBRYONNAIRE.....	54
1. INTRODUCTION.....	54
2. CINETIQUE DE DEVELOPPEMENT DE L'EMBRYON IN VITRO ET QUALITE EMBRYONNAIRE .....	55
<b>2<sup>ème</sup> PARTIE : NOTRE ETUDE .....</b>	<b>62</b>
I. INTRODUCTION.....	63
II. OBJECTIFS DE L' ETUDE.....	63
III. PATIENTES ET METHODES.....	64
1. PATIENTES.....	64
2. STIMULATION ET PONCTION OVARIENNES .....	65
3. FECONDATION IN VITRO .....	65
4. QUALITE EMBRYONNAIRE .....	68
5. TRANSFERT .....	71
6. ANALYSE STATISTIQUE .....	71
IV. RESULTATS .....	71
V. DISCUSSION .....	74
VI. CONCLUSION.....	76
BIBLIOGRAPHIE.....	78
TABLE DES MATIÈRES.....	88

## ABREVIATIONS

Ac	Anticorps
ADAM	A Disintegrin And Metaloprotease protein
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Assistance Médicale à la Procréation
CAM	Cell Adhesion Molecules
CCO	Complexe cumulo-ovocytaire
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
DAO	Dérivés actifs de l'oxygène
FIV	Fécondation in vitro
FSH	Follicle stimulating hormon
GalT	Galactosyltransférase
GnRH	Gonadotrophin Releasing hormon
hCG	Human chorionic gonadotrophin
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection
LH	Luteinizing hormon
MII	Métaphase 2
ml	Millilitre
PN	Pronoyau
pg	Picogramme
RA	Réaction acrosomique
spz	Spermatozoïde
UI	Unité internationale
µl	Microlitre
ZP	Zone pellucide

## INTRODUCTION

Depuis son application humaine à la fin des années 70 et la naissance en Angleterre en 1978 de Louise Brown et celle d'Amandine en France en 1982, la FIV a pris une place prépondérante dans le traitement de la stérilité et est désormais couramment pratiquée. Le souci quasi obsessionnel d'améliorer les chances de grossesses tout en diminuant le risque de grossesses multiples, a incité de nombreuses équipes à étudier et améliorer la qualité des embryons obtenus *in vitro* en vue d'un transfert embryonnaire unique. Ainsi les conditions d'insémination des gamètes et la culture embryonnaire ont été optimisées dans cet objectif avec, en parallèle, une diminution des facteurs pouvant affecter la qualité de l'embryon tels que le stress oxydatif. Ce dernier résulte de l'action néfaste des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) engendrés, notamment, par des spermatozoïdes en surnombre dans les milieux de culture. Ces molécules font partie de la physiologie puisqu'ils interviennent dans des phénomènes de signalisation cellulaire et sont soumis à une régulation endogène. Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production de DAO et les défenses antioxydantes entraînant des effets délétères sur les gamètes et sur l'embryon. Par ailleurs, la fécondation en FIV survient rapidement, dans les quatre heures suivant l'insémination des gamètes. La réduction du temps d'incubation, susceptible d'avoir un effet protecteur sur l'embryon, a encouragé certaines équipes à étudier le bénéfice d'un raccourcissement du temps d'incubation des gamètes en FIV. Cependant, les résultats sont controversés.

Le but de notre étude a été d'évaluer, dans nos conditions, l'impact en FIV d'un protocole d'insémination courte des gamètes (3 heures) comparé à l'insémination classique (18 heures) au cours d'une étude prospective randomisée.



## **1<sup>ère</sup> PARTIE : GENERALITES**

# I. PHYSIOLOGIE DE LA FECONDATION HUMAINE

## 1. INTRODUCTION

La fécondation est l'étape qui assure la création d'un nouvel individu à partir de deux gamètes, haploïdes, mâle et femelle. Elle peut se définir comme l'ensemble des transformations qui se produisent au sein du zygote résultant de l'interaction et de la fusion des gamètes et qui aboutissent à l'association des deux lots haploïdes de chromosomes d'origine maternelle et paternelle.

Initialement, la recherche a d'abord consisté à décrire les événements cytologiques au cours de la fécondation. Cette connaissance s'est étendue et affinée grâce à la microscopie électronique et à la microscopie confocale (Fakan et al., 1976). À partir des années 80, les études biochimiques et moléculaires ont permis de pénétrer dans les mécanismes et de préciser le rôle de chacun des deux gamètes.

## 2. LES ACTEURS DE LA FECONDATION

### 2.1. Le complexe cumulo-ovocytaire (CCO)

Après sa croissance, le follicule mûr préovulatoire mesure environ 20 mm. Il apparaît comme une vésicule transparente faisant protrusion à la surface de l'ovaire. L'accumulation de liquide folliculaire entraîne une augmentation de volume de la cavité antrale. La couche des cellules folliculaires situées en bordure de la cavité, constitue la membrana granulosa. Les cellules folliculaires plus nombreuses, disposées dans une zone délimitée de la paroi folliculaire, constituent le cumulus oophorus. L'ovocyte, directement entouré par une seule assise de cellules folliculaires (corona radiata), fait saillie dans l'antrum. L'ovocyte est situé dans le cumulus dont la couche la plus interne est appelée la corona radiata.

Avant son ovulation, l'ovocyte subit une maturation finale qui consiste en premier lieu en une reprise de la méiose dont la rupture de la vésicule germinative est la première manifestation visible. Le pic de LH, 36 heures avant l'ovulation, permet la reprise de la méiose qui se traduit par la rupture de la vésicule germinale. La première division méiotique s'achève avec

l'expulsion du premier globule polaire et l'apparition de l'ovocyte qui se bloque en métaphase de deuxième division. Parallèlement s'effectue une maturation cytoplasmique qui s'accompagne d'un changement dans les synthèses protéiques auxquelles contribuent les cellules de la granulosa, voire celles du cumulus. Il y a en particulier élaboration d'un facteur qui permet la décondensation de la chromatine du spermatozoïde après la fécondation (*Male Pronucleus Growth Factor, MPGF*). Des granules d'origine golgienne se groupent à la périphérie du cytoplasme sous la membrane plasmique (granules corticaux).

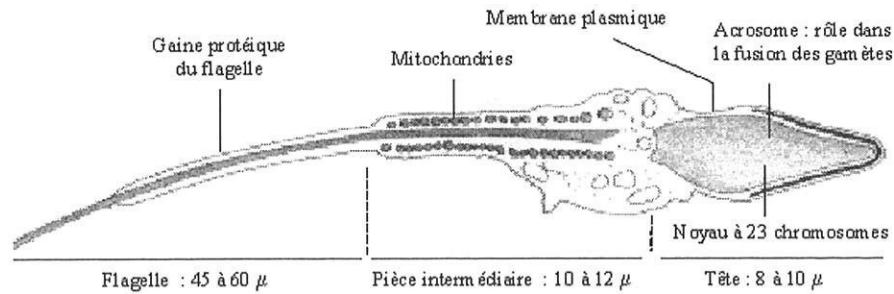
Les cellules du cumulus, qui ont la capacité de sécréter de l'acide hyaluronique, se dissocient en entraînant la libération dans la cavité antrale de l'ovocyte II entouré par la corona radiata (cellules péri-ovocytaires).

L'ovulation consiste en la rupture du follicule mûr avec expulsion de l'ovocyte. L'ovocyte II entouré par les cellules de la corona radiata est alors chassé de l'ovaire avec le liquide folliculaire et capté par le pavillon de la trompe utérine.

## **2.2. Les spermatozoïdes**

Forme ultime de la différenciation des spermatides, les spermatozoïdes sont disposés en bouquet à l'apex des cellules de Sertoli. Ils sont libérés dans la lumière des tubes séminifères, au cours d'un processus appelé spermiation. Puis, ils sont transportés par le fluide testiculaire dans les voies spermatiques intratesticulaires (tubes droits et rete testis) et gagnent les voies génitales excrétrices.

Le spermatozoïde normal (Figure I.1.) apparaît constitué de deux parties distinctes, la tête et le flagelle. La longueur totale est de l'ordre de 60  $\mu\text{m}$  dans l'espèce humaine. La tête, ovoïde, formée par le noyau coiffé de l'acrosome, a une longueur de 3 à 4,5  $\mu\text{m}$  et un diamètre de 1,5 à 3  $\mu\text{m}$ . Le flagelle, effilé, mesure environ 55  $\mu\text{m}$  de long ce qui représente environ 10 fois la longueur de la tête. Le spermatozoïde est entièrement entouré par la membrane plasmique qui s'étend sur les composants structuraux de la tête et du flagelle ainsi que sur la pièce intermédiaire.



**Figure I.1.** Spermatozoïde en microscopie électronique, présentant une gouttelette cytoplasmique  
(D'après le site de Georges Dolisi)

- L'acrosome s'étale sur les deux tiers antérieurs du noyau dont il reste séparé par l'espace sous-acrosomal. Le contenu acrosomal, homogène, contient plusieurs enzymes hydrolytiques telles que la hyaluronidase, la neuraminidase, les phosphatases acides et une protéase ayant une activité trypsinique (acrosine). Lors de la fécondation, ces enzymes interviennent dans la digestion de la zone pellucide (ZP), qui entoure l'ovocyte. La hyaluronidase agit localement en détruisant l'acide hyaluronique qui occupe les mailles de la ZP facilitant ainsi sa traversée par le spermatozoïde. L'acrosine agit à 2 niveaux : elle rompt localement les pontages entre ZP1 et ZP2/ZP3 et par sa structure moléculaire, elle se fixe à la zone pellucide. Chez la souris *Ac*<sup>-/-</sup> déléetée du gène de l'acrosine, la fertilité n'est pas réduite mais *in vitro*, la fécondation est retardée et en cas de compétition entre spermatozoïdes *Ac*<sup>+/+</sup> et *Ac*<sup>-/-</sup> les ovocytes sont toujours fécondés par les spermatozoïdes *Ac*<sup>+/+</sup>. L'acrosine joue donc un rôle facilitant mais non déterminant dans la fixation à la ZP (Adham et al., 1997) et son franchissement.
- Le noyau est entouré par la citerne périnucléaire étroitement accolée à la chromatine, à l'exception de la région postérieure où elle est détachée pour délimiter l'espace nucléaire postérieur. Le nucléoplasme condensé contient quelques vacuoles de faible densité, souvent situées au pôle antérieur du noyau.
- Le flagelle, est constitué de trois segments, les pièces intermédiaire, principale et terminale. Il permet la mobilité du spermatozoïde grâce à son battement.

### 3. LES ETAPES DE LA FECONDATION

Différentes étapes successives ont été mises en évidence :

- l'acquisition de la fécondance du spermatozoïde éjaculé, ou capacitation ;

- la migration jusque dans le pavillon tubaire
- la pénétration du cumulus oophorus par le spermatozoïde ;
- la reconnaissance spécifique par le spermatozoïde de l'enveloppe protectrice de l'ovocyte, la zone pellucide, suivie de son franchissement ;
- l'attachement des membranes plasmiques des deux gamètes puis leur fusion qui permet le passage du spermatozoïde dans l'ovocyte ;
- l'activation de l'oeuf, c'est-à-dire la mise en marche du premier cycle cellulaire qui permet l'enchaînement des premières divisions de segmentation.

### **3.1. Pénétration du cumulus oophorus**

L'ovocyte ovulé est entouré d'un cumulus expansé constitué de cellules et d'une matrice riche en acide hyaluronique. Le cumulus est rapidement dispersé après l'ovulation et les spermatozoïdes entrent en contact avec la zone pellucide de l'ovocyte. Le cumulus, lorsqu'il est présent, n'est traversé que par les spermatozoïdes qui sont capités. Il a longtemps été admis que seuls les spermatozoïdes qui avaient effectué leur réaction acrosomique étaient capables de traverser le cumulus ; ceci grâce à l'action de la hyaluronidase contenue dans l'acrosome du spermatozoïde et libérée lors de la réaction acrosomique, facilitant ainsi son passage en hydrolysant la matrice extracellulaire riche en acide hyaluronique. Cependant des études *in vitro* chez les rongeurs ont montré que pratiquement tous les spermatozoïdes qui atteignent la zone pellucide, après avoir traversé le cumulus, possèdent un acrosome intact (Cherr et al., 1986). La hyaluronidase, qui est associée en faible quantité à la membrane externe du spermatozoïde, serait susceptible de faciliter leur pénétration.

### **3.2. La capacitation**

En 1951 (Yanagimachi, 1994), fut découverte la nécessité d'un séjour du spermatozoïde dans les voies génitales femelles pour qu'il exprime sa fécondance. Il y subit une transformation, appelée capacitation. C'est essentiellement par fragilisation de sa membrane (enlèvement de protéines décapitantes déposées sur la membrane du spermatozoïde dans l'épididyme et/ou apportées par les glandes annexes) et la perte d'une partie du cholestérol intercalé entre les phospholipides membranaires, que le spermatozoïde



devient capacité. Protéines de revêtement et cholestérol libre doivent être considérés comme une protection nécessaire au spermatozoïde afin d'empêcher une réaction acrosomique prématurée. Seule la réaction acrosomique faite au contact de la ZP est utile. Ces changements membranaires rendent apparents et mobiles les récepteurs spermatiques permettant sa fixation à la zone pellucide. Ils provoquent également une modification de la mobilité du spermatozoïde qui devient hyperactif et perd complètement ou épisodiquement sa progression linéaire au profit d'une nage plus ou moins circulaire (Hamamah, 1999).

La capacitation s'effectue selon trois mécanismes:

- *l'enlèvement des protéines de revêtement*. Ce sont les glycosaminoglycanes des voies génitales femelles qui fixent des protéines, provenant de l'épididyme ou des glandes annexes, ces protéines possèdent un récepteur pour ces glycanes ; d'autres protéines non liées à la membrane par des liaisons covalentes sont détachées par l'albumine ; le pH bas du milieu utérin agit dans le même sens ;
- *la perte d'une partie du cholestérol libre* qui se produit grâce à des accepteurs que sont l'albumine et les lipoprotéines présentes dans les sécrétions génitales ;
- *le remaniement de chaînes saccharidiques* des protéines membranaires qui résulte de l'activité d'enzymes présentes dans le milieu génital.

### **3.3. Réaction acrosomique (RA)**

La réaction acrosomique consiste en l'utilisation du contenu de l'acrosome par exocytose pour que le spermatozoïde puisse traverser les enveloppes de l'ovocyte. Elle ne peut se produire qu'après capacitation des spermatozoïdes.

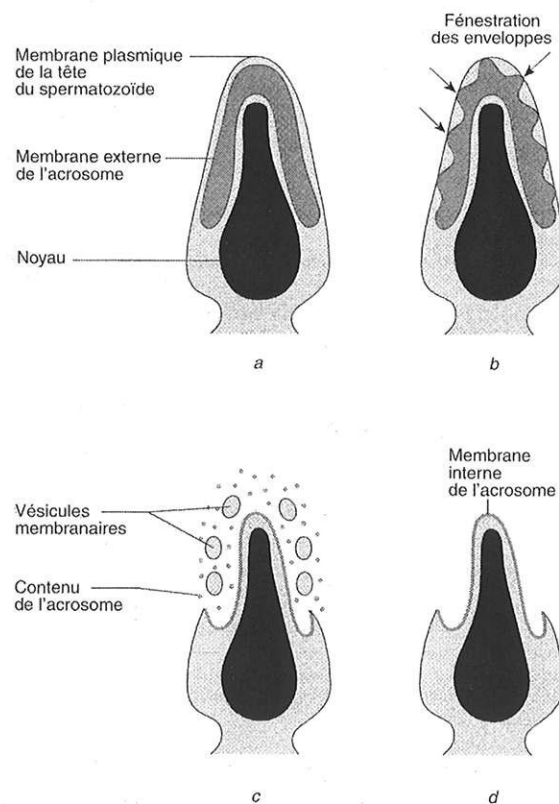
#### **a. L'acrosome**

Situé au sommet de la tête du spermatozoïde entre noyau et membrane plasmique, l'acrosome est une vésicule d'origine golgienne qui se forme lors de la spermiogenèse. L'acrosome est délimité par une membrane, divisée en deux parties : membrane externe en regard de la membrane plasmique et membrane interne en regard de la membrane nucléaire. Ces deux membranes sont différentes dans leur composition en particulier antigénique, propriété qui sera utilisée pour les techniques de mise en évidence de la réaction acrosomique.

Le contenu acrosomique est spécifique. Il contient des glucides, des protéines spécifiques telles SP10 et des enzymes. Parmi ses enzymes, on trouve une enzyme hydrolytique, la hyaluronidase encore appelée protéine PH20 (Deng, 1999) ; l'acrosine, présente sous la forme de proacrosine inactive, est une enzyme protéolytique proche de la trypsine.

### b. Aspects cytologiques

Lors de la réaction acrosomique, il y a formation de vésicules entre les 2 membranes plasmique et acrosomique externe. Ceci va entraîner d'une part la formation de vésicules membranaires formées pour partie de membrane plasmique et pour partie de membrane acrosomique externe, et d'autre part la libération dans le milieu environnant du contenu acrosomique. Après la réaction acrosomique, le spermatozoïde ne possède plus que la membrane acrosomique interne qui se continue par la membrane plasmique au niveau de la cape post-acrosomique. Il s'agit d'une perte de l'acrosome et donc d'un phénomène irréversible.



**Figure I.2.** Réaction acrosomique (*D'après Embryologie humaine : de la molécule à la clinique, F.Encha Razavi, E.Escudier, Masson*)

### c. Aspects moléculaires

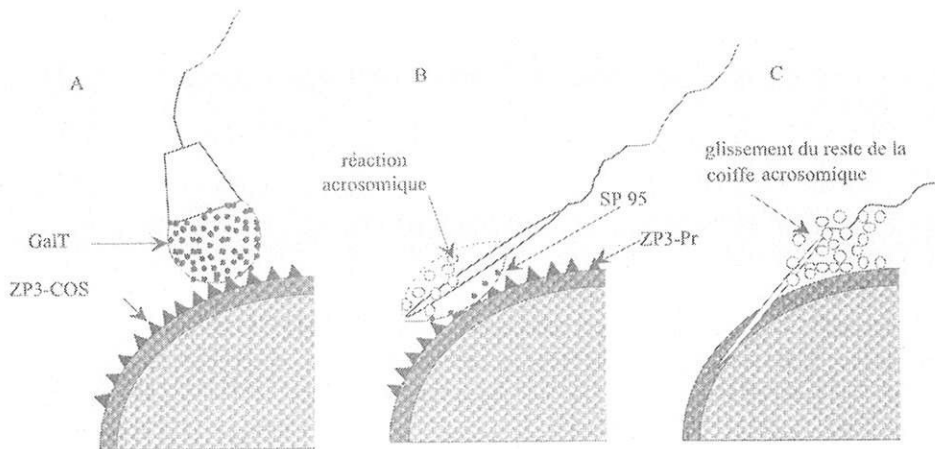
La réaction acrosomique ne peut se faire que s'il y a eu capacitation préalable des spermatozoïdes. Quel que soit l'inducteur, le mécanisme passe toujours par une ouverture de canaux calciques entraînant un influx massif de calcium du milieu extracellulaire vers le spermatozoïde. Cet influx va entraîner une augmentation du pH intracellulaire et une activation de la proacrosine en acrosine qui à son tour va concourir à la vésiculisation entre la membrane plasmique et la membrane acrosomique interne, favorisée par ailleurs par la déstabilisation des membranes apparues lors de la capacitation.

### d. Inducteurs physiologiques de la réaction acrosomique

#### ▪ **Zone pellucide (ZP)**

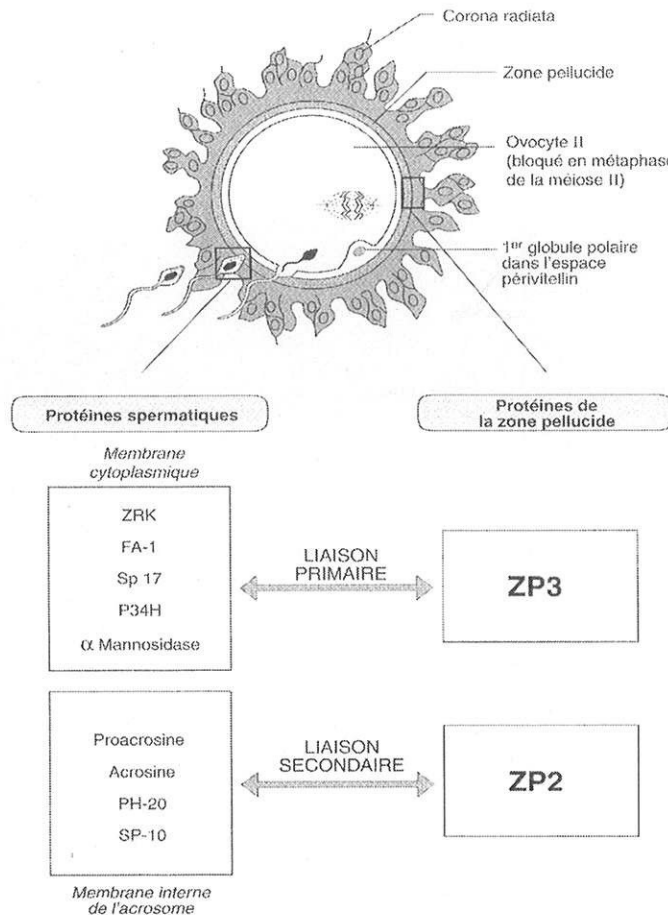
La zone pellucide est une structure gélatineuse constituée d'une couche de glycoprotéines épaisse de plusieurs microns. La valeur normale de son épaisseur a été déterminée après étude en cytométrie en flux de l'ovocyte humain et fixée à 18  $\mu\text{m}$  par l'équipe de Wolf et al. (Wolf et al., 1997 ou 98). Trois glycoprotéines ont été identifiées chez la souris : ZP1, ZP2 et ZP3. Cette dernière est responsable de l'induction de la réaction acrosomique. La ZP3 possède donc une dualité fonctionnelle : d'une part, elle assure la fixation du spermatozoïde et, d'autre part, elle déclenche sa réaction acrosomique. Alors que les chaînes oligosaccharidiques sont impliquées dans le processus d'attachement, c'est la partie protéique de la ZP3 qui intervient dans le déclenchement de la réaction acrosomique (Wassarman et al., 1999). Chez la souris, c'est une galactosyltransférase ancrée dans la membrane plasmique périacrosomique qui se fixe à la chaîne oligosaccharidique de la ZP3 (Figure I.3.). Chez l'homme, il existe d'autres systèmes de fixation comme l' $\alpha$  D-mannosidase du spermatozoïde. L'apex du spermatozoïde entre le premier en contact avec la zone pellucide et c'est à ce niveau que débute la fixation, puis le nombre de sites de fixation augmente et la tête du spermatozoïde se couche à plat sur la zone pellucide. Par un de ses motifs peptidiques, la ZP3 stimule un récepteur spermatique, qui serait la protéine sp 95 (Leyton et al., 1989), déclenchant l'exocytose du grain de sécrétion géant qu'est le contenu de l'acrosome. C'est la réaction acrosomique. Les membranes plasmique et acrosomique externe se détachent comme un capuchon percé de trous. Ce capuchon glisse le long de la pièce intermédiaire tout en restant adhérent à la ZP, ce qui contribue à maintenir le spermatozoïde sur la zone pellucide. L'activation de ce récepteur met en jeu une protéine G qui active une phospholipase C membranaire provoquant la cascade

classique de phosphorylations intracellulaires avec ouverture des canaux calciques membranaires et entrée massive de calcium.



**Figure I.3.** A. Fixation du spermatozoïde de souris à une chaîne oligosaccharidique de la ZP3 (ZP3-COS) par sa galactosyltransférase (GalT). B. Fixation progressive de toute la surface antérieure de la tête du spermatozoïde (vue de profil). Des récepteurs spermatiques se fixent à la partie protéique de la ZP3 (ZP3-Pr) ; cette fixation induit la réaction acrosomique. C. Les membranes acrosomique externe et plasmique forment un capuchon perforé qui glisse jusqu'à la pièce intermédiaire. (D'après *La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme*, C.Thibault, 2<sup>ème</sup> ed., Ellipses)

La fixation à la ZP3 est suivie, après la réaction acrosomique, d'une seconde fixation à la ZP2 qui conforte l'ancrage du spermatozoïde quand la membrane acrosomique a disparu. Cette fixation est irréversible. Elle met en jeu une molécule d'adhésion appartenant à la famille des CAM (*Cell Adhesion Molecules*), la protéine PH-20. Elle est liée à la membrane acrosomique interne, devenue la membrane plasmique du spermatozoïde après la réaction acrosomique, et à la membrane plasmique post acrosomique.



**Figure I.4.** Fécondation : molécules intervenant dans les interactions spermatozoïde-zone pellucide  
 (D'après *Embryologie humaine : de la molécule à la clinique*, F.Encha Razavi, E.Escudier, Masson)

### ▪ Progestérone

La progestérone entraîne une élévation du calcium intracellulaire en se fixant à un récepteur spécifique qui active une autre protéine G. Cependant, il est peu vraisemblable que la progestérone présente dans le liquide utérin et tubaire joue un rôle physiologique *in vivo*, puisque l'acrosome des spermatozoïdes présent en phase lutéale dans les trompes demeure intact et que la réaction acrosomique est toujours induite au contact de la zone pellucide. Cette constatation implique que dans les voies génitales femelles, s'établit une nouvelle protection de la membrane du spermatozoïde.



### 3.4. La fusion des gamètes (Wolf et al., 2005)

La fécondation chez les mammifères est conditionnée par deux étapes successives : la fixation et la fusion des membranes du spermatozoïde et de l'ovocyte. Le processus de fusion est sous la dépendance d'une série d'interactions moléculaires dont les principaux acteurs sont la fertiline du spermatozoïde, les intégrines ovocytaires et les molécules de la famille des tétraspanines. (Primakoff et Myles, 2002; Wassarman et al., 2001).

La famille des intégrines regroupe des protéines transmembranaires possédant un domaine  $\alpha$  et un domaine  $\beta$ . Elles sont impliquées dans des interactions entre cellules mais également entre cellules et matrice extracellulaire. La sous unité  $\beta 1$  peut s'associer avec au moins 10 sous unités  $\alpha$  différentes. Les intégrines sont considérées comme des molécules de signalisation (Liddington et Ginsberg, 2002).

Leur adhésion induit des signaux de régulation incluant des phosphorylations de protéines contrôlant ainsi la croissance, la mort, la migration et la différenciation cellulaires ainsi que l'induction génique. Leur efficacité dans les phénomènes d'adhésion dépend également de la qualité de leur stimulation. En effet, l'affinité des intégrines pour leurs ligands varie selon leurs modifications à la surface cellulaire et leurs associations avec d'autres protéines transmembranaires (Sanchez-Mateos et al., 1996; Bazzoni et Hemler, 1998; Schwartz, 1992).

Les tétraspanines sont des protéines de surface possédant quatre domaines transmembranaires et forment des complexes avec d'autres protéines, membranaires pour certaines d'entre elles. Elles contribuent à la formation de complexes moléculaires à la surface de la cellule et participeraient à la régulation fonctionnelle des protéines auxquelles elles s'associent. Ainsi, deux intégrines présentes à la surface de l'ovocyte,  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 3\beta 1$ , forment des complexes stables avec la tétraspanine CD151 (Fitter et al., 1999; Serru et al., 1999; Yauch et al., 1998).

Cette dernière se fixe également à d'autres tétraspanines telles que le CD9 (Serru et al., 1999; Yauch et al., 1998; Ito et al., 2003; Charrin et al., 2003; Berditchevski et al., 2002).

Le rôle de l'intégrine  $\alpha 6$  et  $\beta 1$  et de la tétraspanine CD9 dans la fécondation chez la souris a été largement étudié. Le rôle de  $\alpha 6\beta 1$  est encore sujet à controverse. Des études basées sur l'utilisation d'anticorps ont suggéré que  $\alpha 6\beta 1$  pouvait constituer un récepteur pour la fixation du spermatozoïde à l'ovocyte (Almeida et al., 1995), mais cette conclusion n'a pas été retrouvée dans d'autres études utilisant des méthodes différentes de contournement de la zone pellucide (Evans, 1999).

Récemment, l'analyse d'ovocytes de souris délétées du gène codant pour  $\alpha 6$  ou  $\beta 1$  a montré que ces intégrines n'étaient pas essentielles à la fixation et à la fusion des gamètes (Miller et al., 2000).

Ces données ne peuvent cependant pas complètement exclure le rôle de  $\alpha 6\beta 1$ . Il a été suggéré que cette intégrine interviendrait dans la fixation de la fertiline  $\beta$  (ADAM 2) et de la cyritestine (ADAM 3), deux membres de la famille ADAM exprimés à la surface du spermatozoïde (Chen et al., 1999; Chen et Sampson, 1999) (Takahashi et al., 2001; Tomczuk et al., 2003)

Cependant d'autres auteurs ont affirmé que la fertiline  $\beta$  interagirait avec une autre protéine, l'intégrine  $\beta 1$  localisée à la surface de l'ovocyte. (Evans et al., 1997; Zhu et Evans, 2002).

Le rôle de CD9 dans la fusion du spermatozoïde et de l'ovocyte a été démontré par l'incapacité pour les ovocytes de souris KO pour CD9 de fusionner avec le spermatozoïde (Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000; Kaji et al., 2000) ainsi que par l'inhibition de la fusion après blocage de CD9 par des anticorps anti CD9 (Chen et al., 1999; Le Naour et al., 2000; Miller et al., 2000).

Cependant, son mode d'action reste à ce jour peu connu. Cette molécule ne serait pas un récepteur pour le spermatozoïde mais plutôt une molécule d'adhésion aux tétraspanines à la surface de l'ovocyte.

Les mécanismes de la fécondation ont été peu étudiés chez l'humain du fait de la rareté des ovocytes. L'expression de tétraspanines n'a pas été mise en évidence chez l'humain tandis que l'expression de certaines intégrines telles que  $\alpha 6$  et  $\beta 1$  à la surface des ovocytes a été rapportée (Fusi et al., 1992; Ji et al., 1998; Campbell et al., 1995b).

L'implication de l'intégrine  $\beta 1$  dans le processus de fusion a été mise en évidence par Wolf et al. (Ji, 1998). Par ailleurs, il a été récemment démontré par l'équipe de Wolf, que CD9 contrôle la formation de l'intégrine  $\alpha 6\beta 1$  localisée en groupes à la surface de la membrane plasmique de l'ovocyte chez l'humain et la souris. Dans la même étude, il a également été montré un rôle de  $\alpha 6\beta 1$  et de la tétraspanine CD151 dans la fusion du spermatozoïde et de l'ovocyte chez l'humain (Wolf et al., 2005, accepté pour parution).

#### **4. ACTIVATION DE L'OVOCYTE**

L'activation de l'ovocyte par le spermatozoïde entraîne des modifications de son métabolisme ainsi que des remaniements cellulaires importants. Une des premières étapes de ce phénomène est un changement de potentiel transmembranaire et une mobilisation massive

du calcium intracellulaire (ondes calciques). Les manifestations cellulaires qui accompagnent l'activation sont l'exocytose des granules corticaux et l'achèvement de la deuxième division méiotique.

#### **4.1. Changement de potentiel transmembranaire et mobilisation du calcium intracellulaire**

Les changements de potentiel transmembranaire qui accompagnent la fusion du spermatozoïde et de l'ovocyte se manifestent par une succession d'hyperpolarisations négatives qui se produisent à des intervalles de l'ordre de la minute. Ces vagues d'hyperpolarisation entraînent une diminution progressive du potentiel de base. Elles sont dues à un accroissement de la perméabilité membranaire au potassium consécutive à l'augmentation intracellulaire de calcium.

La fusion du spermatozoïde et de l'ovocyte s'accompagne, en effet, d'une libération massive de calcium à partir des réservoirs intracellulaires de l'oeuf. Cette entrée de calcium qui débute au niveau du site de fusion 10 à 30 secondes après l'attachement du spermatozoïde, se propage dans l'ensemble de l'oeuf en quelques secondes. Elle est suivie de plusieurs flux entrants de calcium successifs qui se produisent à quelques minutes d'intervalle.

#### **4.2. Dégranulation des granules corticaux**

Les granules corticaux qui, dans l'ovocyte mature, sont alignés le long de la face interne de la membrane plasmique, sont déchargés dans l'espace périvitellin par un phénomène d'exocytose au moment de la fécondation.

La libération du contenu des granules corticaux est consécutive à la fusion des gamètes et à la mobilisation du calcium intracellulaire qui en découle. Les granules corticaux contiennent entre autres, des enzymes hydrolytiques qui sont ainsi libérées et qui modifient la zone pellucide. Ces enzymes sont à l'origine de la modification des glycoprotéines sulfatées de la zone pellucide, induisant ainsi son durcissement et la rendent impénétrable par des spermatozoïdes surnuméraires. Ce blocage efficace de la polyspermie n'est cependant pas limité à la zone pellucide ; il intervient également au niveau de la membrane plasmique de l'ovocyte.

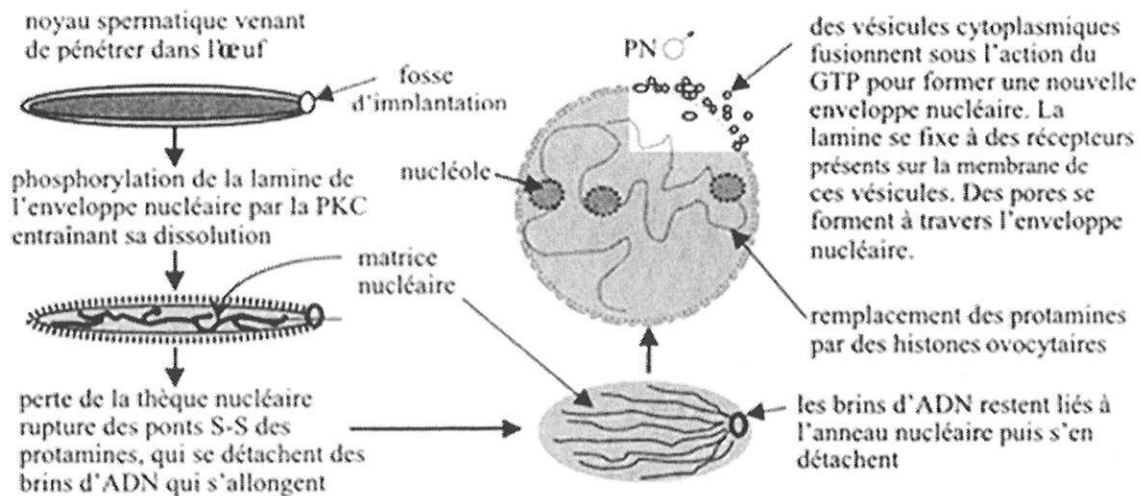
### **4.3. Achèvement de la seconde division méiotique de l'ovocyte et expulsion du deuxième globule polaire**

L'ovocyte mûr est arrêté en métaphase II (MII). Sous l'effet de l'activation, il termine sa seconde division méiotique, passe en anaphase, en télophase, puis se divise en donnant deux cellules filles de tailles inégales : l'ovocyte II conserve la quasi totalité du cytoplasme et le deuxième globule polaire reçoit essentiellement du matériel nucléaire. Ces deux cellules contiennent chacune la même quantité d'ADN maternel.

## **5. FORMATION, DEVELOPPEMENT ET MIGRATION DES PRONOUX**

### **5.1. Décondensation du noyau du spermatozoïde (Figure I.5.)**

Avant d'être transformé en un pronoyau mâle fonctionnel, le noyau du spermatozoïde doit subir un certain nombre de modifications : dissolution de l'enveloppe nucléaire, réduction des ponts disulfures des protéines associées à l'ADN, décondensation de la chromatine et remplacement des protamines (nucléoprotéines spécifiques du spermatozoïde) par des histones. Sous l'effet de l'activation, le cytoplasme de l'ovocyte passe progressivement de l'état métaphasique à l'état interphasique ; les changements qui interviennent dans le noyau du spermatozoïde sont conditionnés par cette transition. La dissolution de l'enveloppe nucléaire se produit au moment de son incorporation dans l'ovocyte en métaphase II. La chromatine d'origine spermatique se trouve ainsi directement en contact avec le cytoplasme ovocytaire ; elle se décondense pendant la transition métaphase II - télophase, alors que la chromatine d'origine ovocytaire est encore fortement condensée.



**Figure I.5.** Formation du pronoyau mâle (*D'après La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme, C.Thibault, 2<sup>ème</sup> ed., Ellipses*)

## 5.2. Formation et développement des pronoyaux

Les pronoyaux mâle et femelle se forment dans le cortex du zygote. Une enveloppe nucléaire se forme autour de la chromatine d'origine paternelle décondensée et autour des chromosomes maternels qui subsistent dans l'œuf après la deuxième division méiotique. La chromatine d'origine maternelle est alors très condensée mais se décondense progressivement. Plusieurs nucléoles sont généralement présents dans les pronoyaux. Ils sont composés d'un matériel dense et compact. La synthèse d'ADN s'effectue simultanément dans les pronoyaux mâle et femelle. La réplication de l'ADN ne commence que lorsque les pronoyaux sont complètement développés.

## 5.3. Migration des pronoyaux vers le centre de l'œuf

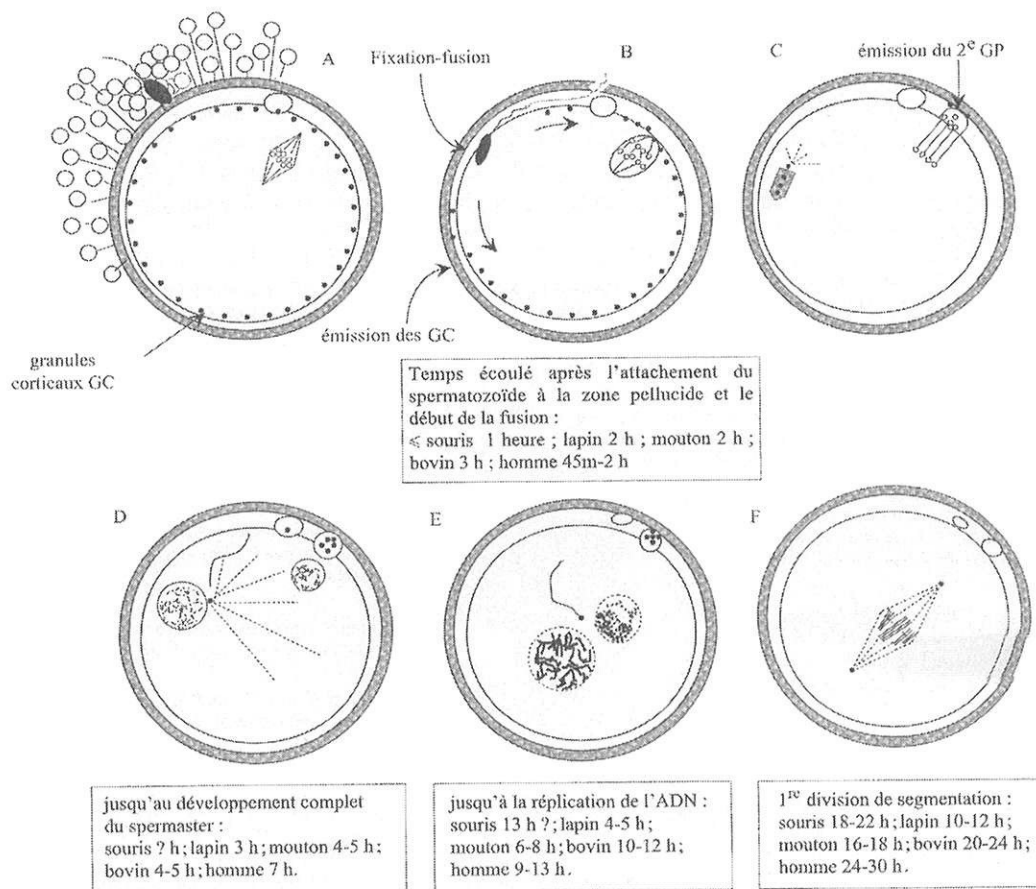
Les pronoyaux formés dans le cortex de l'œuf se déplacent vers le centre de la cellule, de façon à ce que les deux lots de chromosomes d'origine maternelle et paternelle puissent se rassembler sur le fuseau de première division de segmentation. Les microfilaments et les microtubules, structures dynamiques se polymérisant et se dépolymérisant successivement, sont impliqués dans la migration des pronoyaux au centre de l'œuf. Les microtubules se développent à partir du centrosome, apporté par le spermatozoïde. Ils s'organisent en un demi



fuseau, appelé spermaster, qui s'étend progressivement à l'oeuf tout entier jusqu'à rentrer en contact avec le pronoyau femelle. Il se rétracte alors, ce qui a pour effet d'entraîner les deux pronoyaux vers le centre de l'oeuf. Quand les pronoyaux se rapprochent, les centrioles se placent entre eux, puis il se répliquent et vont occuper les deux pôles du fuseau de la première division de segmentation.

À la fin du premier cycle cellulaire, les chromosomes paternels et maternels se condensent dans les pronoyaux en apposition, mais ne fusionnent pas. Les enveloppes nucléaires des deux pronoyaux forment des indentations et sont très proches l'une de l'autre. Après leur rupture, les chromosomes viennent s'aligner sur le fuseau de division mitotique qui se forme à partir des microtubules et des centrosomes déjà présents dans cette région cytoplasmique.

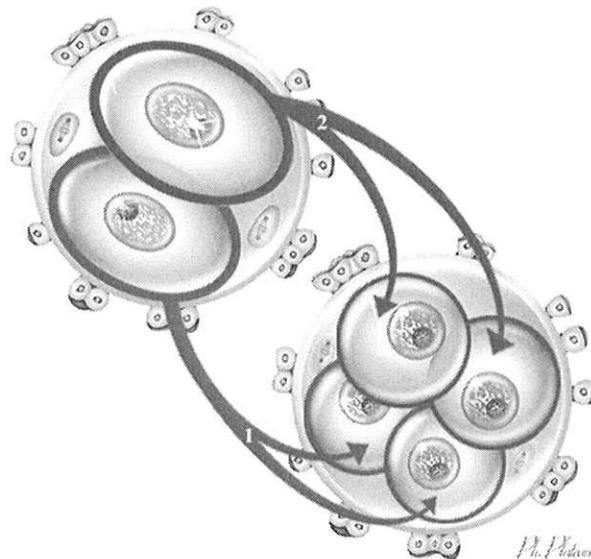
Au total, la fécondation permet le rétablissement de la diploïdie (46 chromosomes), le réassortiment de deux programmes génétiques différents (hérédité biparentale), et le déterminisme sexuel basé sur le dimorphisme chromosomique (XX ou XY).



**Figure I.6.** Les étapes de la fécondation jusqu'à la première division de segmentation (*D'après La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme, C.Thibault, 2<sup>ème</sup> ed., Ellipses*)

## II. PREMIERE SEMAINE DE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

La fécondation marque le début de la période embryonnaire caractérisée par une succession de divisions cellulaires et l'apparition des premières différenciations. Les pronoyaux maternel et paternel se forment dans les 3 à 6 heures qui suivent le début de la fécondation. Ils sont alors dans le même environnement cytoplasmique, et réalisent séparément la première réplication de leur ADN. La fusion des PN s'appelle la syngamie. Le délai entre la syngamie et la première division mitotique est constant et est égal à 3 heures (van Wissen et al., 1995). La première division de segmentation en 2 cellules (Figure II.1.) sépare le zygote en deux blastomères de taille à peu près équivalente et survient entre 11 et 20 heures après la fécondation. Le début du développement de l'embryon est donc lent. La deuxième division (stade 4 cellules) est légèrement asynchrone et se traduit par l'existence transitoire d'un stade 3 cellules pendant une à deux heures environ. Jusqu'à la troisième division de segmentation (stade 8 cellules), les divisions cellulaires sont égales, mais s'effectuent sans régularité dans l'orientation des plans de division. Ces divisions cellulaires se produisent relativement lentement (une division toutes les 24 heures).



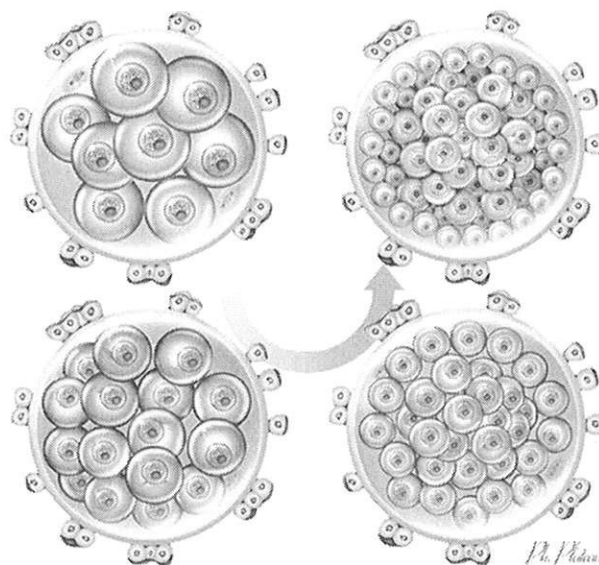
**Figure II.1.** La segmentation (*D'après L'embryogenèse humaine, D.Rabineau, J.M. Dupont, P. Plateaux*)

## 1. LA COMPACTION DE LA MORULA

La compaction se produit après le stade 8 blastomères (environ 4 jours après la fécondation) et correspond à l'acquisition d'une polarité cellulaire et à la différenciation des deux premiers types de cellules embryonnaires (masse cellulaire interne et trophoblaste).

### 1.1. Avant la compaction

Dans la morula, jusqu'au stade 8 cellules, les blastomères occupent des positions équivalentes, avec une face interne en regard d'autres blastomères et une face externe saillant à la surface de la morula (étape de pré compaction). Jusqu'à ce stade, les blastomères sont des cellules sphériques, apolaires (sans différence entre les pôles apical et basal), dépourvues de jonctions intercellulaires, dissociables les unes des autres (Figure II.2.). À cet instant, la membrane cytoplasmique des blastomères, perméable aux petites molécules, présente des microvillosités sur toute sa surface.



**Figure II.2.** Les divisions successives jusqu'au stade de morula (*D'après L'embryogenèse humaine, D.Rabineau, J.M. Dupont, P. Plateaux*)

## 1.2. La compaction proprement dite

Entre les stades 8 et 16 blastomères, la morula est le siège de modifications morphologiques et fonctionnelles. L'aspect extérieur de la morula se modifie, sa surface devient lisse, compacte et imperméable au milieu extérieur (Figure II.3.). Ces modifications ne concernent que les blastomères périphériques et résultent d'une polarisation cytoplasmique et membranaire.

La polarisation du cytoplasme s'annonce par une redistribution des organites (appareil de Golgi, mitochondries, lysosomes, vésicules d'endocytose), une restriction des microvillosités au pôle apical de la cellule et une réorganisation des filaments d'actine et des microtubules du cytosquelette.

Les modifications membranaires se caractérisent par la mise en place de jonctions intercellulaires serrées au pôle apical des cellules. Il se constitue à la surface de la morula une couche cellulaire étanche qui isole la morula du milieu extérieur. Au niveau de leur pôle basal, les cellules périphériques développent des jonctions gap et communiquent avec les cellules centrales de la morula.

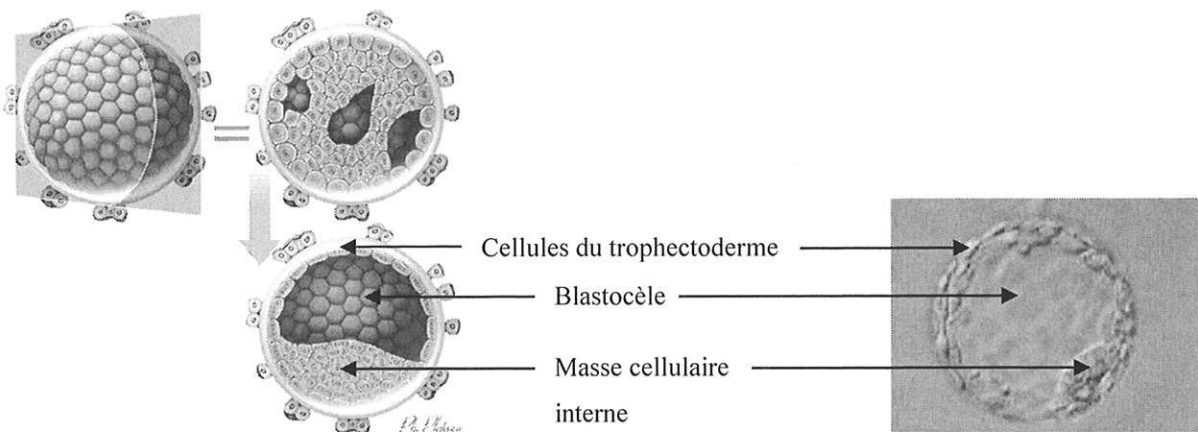
La compaction signe ainsi l'apparition de deux populations cellulaires de même origine et de destinées différentes (lignage). Les cellules apolaires constituent au centre de la morula, la masse cellulaire interne (bouton embryonnaire). Les cellules polaires forment autour du bouton embryonnaire la couronne de trophoblaste (trophectoderme).



**Figure II.3.** Morula compactée

## 2. FORMATION DU BLASTOCYSTE

Vers le 5<sup>ème</sup> jour (entre les stades 32 et 64 blastomères), la première cavité embryonnaire (blastocèle) se forme à l'intérieur de la morula par la confluence de micro sécrétions trophoblastiques et s'intercale entre la masse cellulaire interne et le trophoblaste (Figure II.4.). À ce stade, l'apparition de desmosomes sur la face latérale des cellules trophoblastiques renforce leur étanchéité et isole le blastocyste. Le blastocèle refoule la masse cellulaire interne au pôle dit embryonnaire et permet de définir dans le trophoblaste 2 zones : polaire (en contact avec la masse cellulaire interne) et murale (en contact avec le blastocèle). Dès lors, la morula prend le nom de blastocyste.

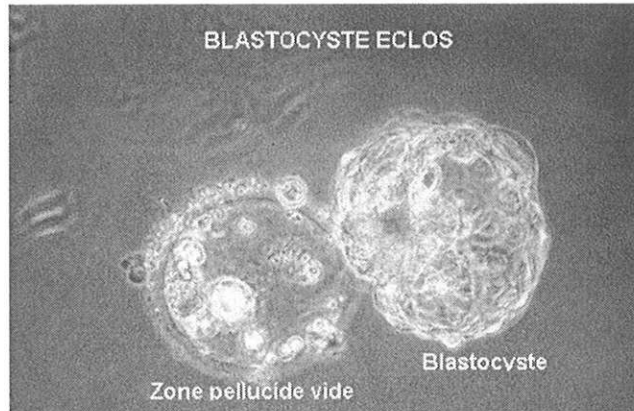


**Figure II.4.** Stade J5-J6 : formation du blastocyste (D'après *L'embryogenèse humaine*, D.Rabineau, J.M. Dupont, P. Plateaux)

## 3. EXPANSION DU BLASTOCYSTE

Après sa formation, le blastocyste subit une phase d'expansion d'amplitude variable aboutissant à une forme sphérique de diamètre également variable selon les espèces. Au début de l'expansion, provoquée par l'afflux de liquide dans le blastocèle, la zone pellucide se distend ; puis, il se forme un ou plusieurs orifices par lequel le blastocyste s'échappe activement par contractions : c'est l'éclosion (Fléchon et al., 1978) qui se produit au 6<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire. Seuls les blastocystes sortis de leur zone pellucide peuvent s'implanter. L'élimination de la zone pellucide permet un contact direct entre les cellules du

trophoblaste et celles de l'épithélium utérin. Dans l'espèce humaine, la perte de la zone pellucide se produit par protéolyse.



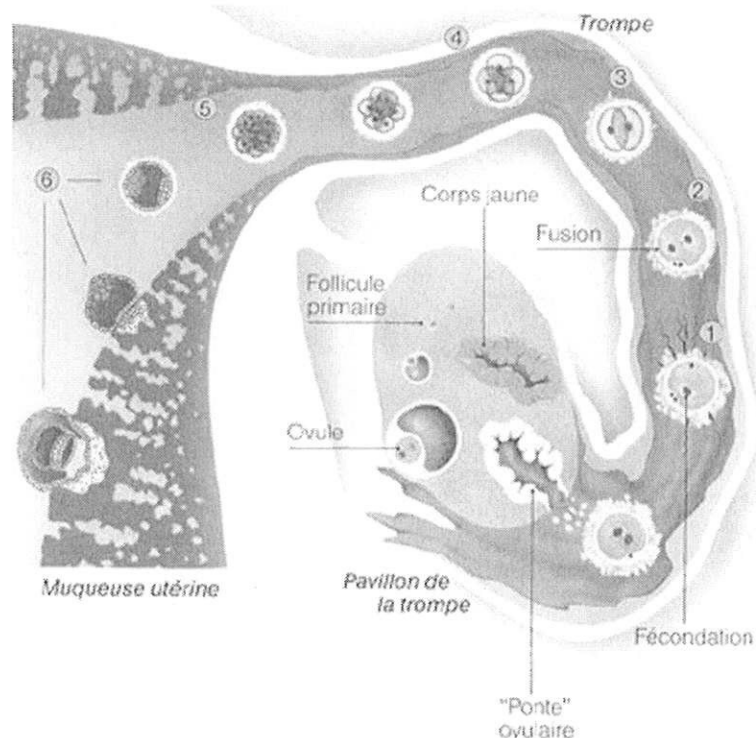
**Figure II.5.** Ecllosion de blastocyste (*D'après le site du CHU Toulouse*)

#### 4. MIGRATION DE L'EMBRYON

Les premières segmentations se font en même temps que la migration. La migration du zygote dans la trompe se fait de façon progressive du fait des contractions des cellules musculaires lisses de la paroi tubaire (péristaltisme tubaire sous l'influence de la progestérone). Elle est facilitée par les mouvements des cils. Ainsi, lors de la migration (Figure II.6.) :

- la fécondation et le stade 2 blastomères, au 2<sup>ème</sup> jour, s'observent au niveau du tiers externe de la trompe (ampoule).
- Les stades 4 et 8 blastomères, au 3<sup>ème</sup> jour, s'observent au niveau de l'isthme.
- Le stade morula, au 4<sup>ème</sup> jour, s'observe au niveau du segment interstitiel, c'est-à-dire dans la zone où la trompe traverse la paroi utérine.
- Au 5<sup>ème</sup> - 6<sup>ème</sup> jour, le blastocyste est libre dans la cavité utérine.
- Au 7<sup>ème</sup> jour enfin, le blastocyste s'accôle à l'endomètre par son pôle embryonnaire.





**Figure II.6.** Migration de l'ovocyte fécondé de la trompe à l'utérus : après que la fécondation ait eu lieu (1), les pronuclei mâle et femelle fusionnent (2). L'embryon obtenu subit alors une première division (3) puis une seconde (4), etc., et prend l'aspect d'une mûre (morula : 5). Il s'implante dans la cavité utérine environ 7 jours après la fécondation au stade appelé blastocyste (6) constitué d'un bouton embryonnaire et d'une enveloppe cellulaire (trophoblaste) qui deviendra le placenta (*D'après le site du CHU Marseille*)

### III. LA FECONDATION IN VITRO : ASPECTS CLINIQUES ET TECHNIQUES

#### 1. INTRODUCTION

La première fécondation *in vitro* d'un ovocyte de mammifère, confirmée cytologiquement, a été réalisée en 1954 chez la lapine à partir de spermatozoïdes capotés dans l'utérus et d'ovocytes récemment ovulés. Cinq ans plus tard, la naissance de lapereaux confirmait la normalité biologique des embryons issus de la fécondation *in vitro*. Les premières FIV dans ces conditions ont été obtenues chez les rongeurs (1963-1968) puis chez l'homme en 1969. En 1978, naît en Angleterre Louise Brown, le premier enfant issu d'une

fécondation *in vitro*. En France, après la naissance d'Amandine en 1982, plus de 60 000 enfants seront conçus grâce à cette technique.

La fécondation *in vitro* (FIV) consiste à recueillir les gamètes du couple pour réaliser une fécondation extracorporelle, puis à transférer les embryons ainsi obtenus dans l'utérus. Contrairement à d'autres techniques d'AMP, la FIV nécessite la réalisation d'une série d'étapes *in vitro* aboutissant à l'obtention d'embryons. Le conditionnement des gamètes *in vitro*, l'interaction gamétique, la fécondation proprement dite, et le développement embryonnaire sont d'une très grande importance. L'obtention de grossesse à un taux régulièrement élevé exige une optimisation constante et quasi obsessionnelle de chaque étape du processus de la réalisation de la FIV.

La procédure de la FIV se déroule sur deux ou trois jours, voire 5 si elle se poursuit en culture prolongée et elle comporte plusieurs étapes :

- A J0, la récupération et la mise en culture des ovocytes après stimulation ovarienne, le recueil et la préparation du sperme, et l'insémination.
- A J1, après 18 à 22 heures d'incubation, les ovocytes sont décoronisés afin de déterminer lesquels sont fécondés, les zygotes obtenus sont alors incubés encore 24 heures.
- A J2, après 44 à 48 heures, ou J3, après 72 heures, les embryons sont soit transférés *in utero*, soit congelés pour un transfert ultérieur. Parfois la culture est prolongée jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour.

## **2. ASPECTS CLINIQUES**

### **2.1. La stimulation ovarienne**

Le but de la stimulation ovarienne est de recueillir un bon nombre d'ovocytes matures pour multiplier les chances d'obtenir des embryons.

Plusieurs types de protocole de stimulation sont utilisés. Ils dépendent du mode d'utilisation des agonistes ou des antagonistes du GnRH. Après l'administration d'un agoniste du GnRH, il se produit une première phase de libération de LH et FSH (« flare up »), suivie d'une phase de désensibilisation hypophysaire correspondant à l'effondrement de la LH et de la FSH, entraînant une baisse d'oestradiol et de progestérone.

Dans le protocole long, on attend la désensibilisation pour commencer la stimulation par les gonadotrophines. Compte tenu du blocage complet attendu pour démarrer la stimulation, le démarrage de l'agoniste peut se faire en théorie à n'importe quelle phase du cycle. En pratique, il se fait en général dans les quatre premiers jours du cycle pour les produits retard ou en phase lutéale (J20) pour les produits rapides.

Dans les protocoles courts, l'agoniste est démarré au début du cycle, et l'on utilise le « flare up » pour initier la stimulation en prenant le relais par les gonadotrophines.

Les protocoles utilisant les antagonistes du GnRH sont plus récents. Ils permettent de prévenir ou d'interrompre le pic de LH. Leur action antagoniste n'entraîne pas d'effet « flare up » et la désensibilisation n'est pas nécessaire. Ils peuvent être utilisés en milieu ou en fin de phase folliculaire.

Le monitoring de l'ovulation consiste à mesurer la croissance folliculaire et endométriale par des échographies répétées ainsi que par la mesure des taux d'oestradiol, de progestérone et de LH. Le rythme de la surveillance dépend du protocole choisi, du profil hormonal et des antécédents de la patiente. Dans le protocole long, qui semble donner les meilleurs résultats, on s'assure (18 à 30 jours après l'injection retard ou 10 à 15 jours après les injections quotidiennes) de la désensibilisation par une échographie et la mesure de l'oestradiol. La surveillance est en fait fonction de la réponse ovarienne et répond à deux buts principaux : déterminer le meilleur moment pour déclencher l'ovulation et prévenir le risque d'hyperstimulation sévère. Schématiquement, le déclenchement de l'ovulation est proposé lorsqu'il existe au moins deux à trois follicules de 16 à 18 mm de diamètre et que le taux d'oestradiol est d'environ 200 à 250 pg/ml par follicule de plus de 14 mm.

Le déclenchement est obtenu par l'injection de gonadotrophine chorionique (hCG) (5000 ou 10 000 UI). La ponction ovarienne doit être réalisée environ 34 à 38 heures après le déclenchement pour recueillir des ovocytes matures et éviter que la patiente ait ovulé.

## **2.2. La ponction folliculaire**

La ponction est aujourd'hui réalisée sous contrôle d'une échographie vaginale. La sonde endovaginale est munie d'un guide sur lequel est monté une aiguille qui permet de venir ponctionner et aspirer un à un les follicules de plus de 14 mm. Le liquide folliculaire est transmis au laboratoire qui recherche les CCO. Cette ponction peut être réalisée sous anesthésie générale ou locale, au bloc opératoire.

### 3. ASPECTS TECHNIQUES : DEROULEMENT D'UNE FIV AU LABORATOIRE

#### 3.1. A J0 : Traitement des gamètes et insémination *in vitro*

##### a. Recueil et mise en culture des ovocytes

Les seringues contenant des liquides folliculaires et provenant du bloc opératoire après la ponction ovarienne, doivent être maintenues à 37° C et le plus possible à l'abri de la lumière. L'examen des liquides folliculaires à la recherche des ovocytes est réalisé à la loupe binoculaire équipée d'un plateau chauffant réglé à 37°C.

Les CCO apparaissent à l'oeil nu comme de petites masses bleuâtres. Une fois retrouvés, ils sont délicatement aspirés et lavés dans un milieu de culture afin de diminuer au maximum la présence d'hématies (pouvant altérer la survie des spermatozoïdes au voisinage de l'ovocyte) et de leucocytes (pouvant libérer le contenu de leurs granules intra cytoplasmiques et être à l'origine d'un stress oxydatif pour l'ovocyte). Après lavage, les ovocytes sont placés dans un tube ou dans une boîte à 4 puits contenant 1 ml de milieu de culture, ou en micro goutte sous huile où l'ovocyte séjourne seul jusqu'à l'insémination.

##### b. Préparation du sperme

###### ▪ Le spermogramme

Le sperme doit, de par la loi, être recueilli au laboratoire. Il est le plus souvent recueilli par masturbation dans un récipient approprié à usage unique et à col large. Le délai d'abstinence sexuelle conseillée est de 3 à 5 jours. Ce délai influence le volume et la numération. Le recueil est ensuite placé à 37°C ou à température ambiante pendant 30 minutes à une heure jusqu'à la liquéfaction du liquide séminal. Afin d'éviter une contamination accidentelle du sperme, il est important que le patient procède, avant le recueil du sperme, à un certain nombre d'étapes : une miction, nécessaire pour éliminer les bactéries commensales de l'urètre antérieure et un lavage des mains et du gland avec un savon bactéricide et antifongique, suivi d'un rinçage au soluté physiologique stérile.

Après homogénéisation du prélèvement, un échantillon est prélevé pour établir un spermogramme et un spermocytogramme. Les paramètres mesurés dans le spermogramme sont : le volume (2 – 6 ml), le pH (7,2 – 7,8), le pourcentage de formes mobiles ( $\geq$  à 50 %), la

vitalité (le pourcentage de spermatozoïdes vivants  $\geq 75$  %), la numération ( $\geq 20 \times 10^6$  spz/ml), et le pourcentage des formes typiques ( $\geq 30$  %).

Au vu des données obtenues après réalisation du spermogramme et hormis les situations extrêmes d'anomalie de nombre (azoospermie) ou d'anomalie fonctionnelle (asthénozoospermie sévère, autoagglutination), la méthode de préparation du sperme la plus adaptée pour augmenter le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et éventuellement normaux sera choisie.

#### ▪ **Méthodes de préparation du sperme**

Selon les paramètres spermatiques et l'indication de la FIV, différentes méthodes de préparation de sperme peuvent être adoptées. La migration simple, éventuellement ascendante après élimination du plasma séminal, permet le recueil des spermatozoïdes dans du milieu de culture directement placé au-dessus du sperme et dans lequel ils migrent. Cette méthode est réservée aux spermés normaux. La migration sur gradient de densité est la méthode de préparation du sperme la plus utilisée. Elle permet d'éliminer les débris cellulaires ou acellulaires, les spermatozoïdes portant plusieurs anomalies morphologiques, les germes contenus dans le sperme, ainsi que les agglutinats. Les gradients peuvent être simples, ne comprenant que 2 niveaux de concentration (90 % et 45 %) ou plus, comprenant 6 concentrations allant de 30 % à 90 %. Dans ce dernier cas, la sélection est plus rigoureuse, mais moins rentable. Elle est particulièrement indiquée en cas de leucospermie persistante. Enfin, les spermés avec anticorps doivent être recueillis directement dans un récipient approprié à usage unique contenant 2 ml de milieu de culture. Le coagulum est alors immédiatement disloqué à l'aide d'une pipette et le sperme est lavé ou passé sur gradient de densité. Recueillir le sperme directement dans du milieu de culture permet de limiter la fixation des anticorps sur la surface des spermatozoïdes.

#### c. L'insémination *in vitro*

##### ▪ **Moment de l'insémination**

Le moment idéal pour inséminer les ovocytes est deux heures après l'expulsion du globule polaire. Celui-ci dépend à la fois du nombre de ponctions folliculaires et du mode de fonctionnement du laboratoire. Le débat sur le choix du moment idéal de l'insémination demeure encore ouvert et la majorité des équipes détermine le moment de l'insémination selon l'aspect des ovocytes, mais aussi selon le mode de fonctionnement du laboratoire.

### ▪ **Insémination *in vitro* des ovocytes**

Il existe une variation du nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés par ovocyte selon les laboratoires. En moyenne, 100 000 à 150 000 spermatozoïdes mobiles par millilitre, soient 3000 à 4000 spermatozoïdes mobiles par ovocyte en microgoutte de 20 à 30µl, sont déposés délicatement dans la boîte identifiée au nom de la patiente et contenant les ovocytes. Elle est ensuite rapidement remise dans l'incubateur à 37°C. Le nombre de spermatozoïdes déposés au voisinage de l'ovocyte *in vitro* est très élevé si on le compare aux quelques dizaines de spermatozoïdes présents dans l'ampoule tubaire *in vivo*. Mais *in vitro*, ce nombre élevé de spermatozoïdes permet, surtout en l'absence de sélection naturelle, d'obtenir des taux de fécondation élevés.

### **3.2. A J1 : Décoronisation et observation des ovocytes**

L'observation des ovocytes intervient en général entre 18 et 22 heures après l'insémination *in vitro*. Elle recherche les signes de fécondation à savoir la présence de deux pronoyaux et de deux globules polaires (Figure III.1.). Mais cette étape ne peut être visualisée que lorsque les cellules périovocytaires sont dispersées. La décoronisation de l'ovocyte est pratiquée mécaniquement à l'aide d'un fin capillaire. Une fois l'ovocyte décoronisé, il est ensuite transféré dans un milieu de culture neuf et équilibré pour être examiné. L'examen se pratique très rapidement sous un microscope inversé maintenu à 37°C.



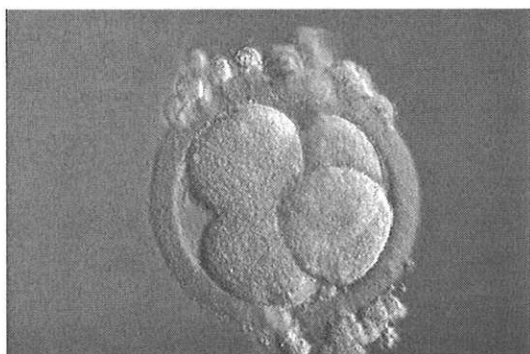
**Figure III.1.** Zygote au stade de 2 pronoyaux (*D'après site CHU Besançon*)



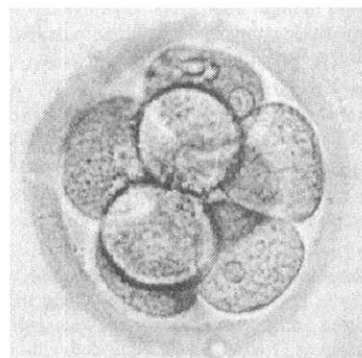
### 3.3. A J2 ou J3 : Observation et transfert embryonnaire

#### a. Observation embryonnaire

Quarante huit heures après l'insémination *in vitro* (J2), les embryons ont atteint le stade de 4 blastomères et 8 blastomères à J3 (Figure III.2.). La qualité des embryons est un facteur pronostique important de leur chance d'implantation. À ce stade, la priorité est donnée à la sélection du meilleur embryon à transférer. Celle-ci est basée essentiellement sur l'aspect morphologique de l'embryon le jour du transfert et comporte une étude des blastomères en observant leur nombre, leur régularité et leur homogénéité. De plus, une évaluation du pourcentage de fragments cytoplasmiques est réalisée dans le même temps. Différentes classifications concernant la qualité embryonnaire existent, permettant la sélection de l'embryon à transférer (voir Chapitre « Evaluation de la qualité embryonnaire »).



à J2



à J3

**Figure III.2.** Morphologie embryonnaire idéale à J2 (4 cellules), à J3 (8cellules) et sans fragments

#### b. Transfert embryonnaire

Le jour du transfert, les embryons sont montés dans un cathéter et transférés dans l'utérus. L'orifice cervical est nettoyé avec du milieu de culture ou du sérum physiologique et un cathéter d'essai est introduit pour s'assurer que le passage se fait sans difficulté. Les embryons sont alors montés dans le cathéter de transfert lui-même branché sur une seringue. Celui-ci est introduit délicatement dans l'utérus en évitant de toucher le fond utérin. Les embryons sont déposés dans la cavité utérine après avoir délicatement poussé sur le piston de la seringue. Le cathéter est retiré une à deux minutes après le transfert. Aujourd'hui, certaines



équipes proposent le transfert écho-guidé. Un repos de 20 minutes est généralement observé après le transfert.

Une supplémentation de la phase lutéale est démarrée le jour du transfert par de la progestérone naturelle administrée par voie vaginale. Le test de grossesse est effectué 12 à 14 jours après le transfert embryonnaire par un dosage de  $\beta$ hCG sanguines.

### c. Congélation des embryons

Les embryons non transférés peuvent être conservés congelés à  $-196^{\circ}\text{C}$  dans de l'azote liquide. Les protocoles de congélation associent l'utilisation d'un cryoprotecteur, une descente thermique lente réalisée de manière automatique, et une induction de cristallisation en masse ou « *seeding* » (afin d'éviter la formation de cristaux lors de la congélation de l'eau). Les blastomères qui sont de volumineuses cellules supportent assez mal la cryopréservation si bien que seuls les embryons de bonne qualité sont habituellement congelés.

### d. La culture prolongée

Dans le but d'améliorer le taux d'implantation, on peut envisager de prolonger la culture *in vitro* des embryons jusqu'au stade de blastocyste. La culture prolongée permettra d'identifier et d'éliminer les embryons dont la segmentation s'arrête après quelques divisions et de réaliser un transfert plus physiologique (transfert de blastocyste dans l'utérus).

#### ➤ *Techniques de culture*

- **la coculture** : elle consiste à cultiver les embryons jusqu'au stade de blastocyste sur un tapis cellulaire, *in vitro*. Il y a plus d'une décennie, les embryons placés en milieu simple étaient soumis, *in vitro*, à un arrêt de développement, au moment de l'activation du génome embryonnaire. Pour relever le blocage des divisions cellulaires, et apprécier l'aptitude des zygotes au développement, les embryons de mammifères ont été cultivés sur des tapis cellulaires de différentes origines. Divers supports cellulaires (cellules trophoblastiques, cellules d'oviducte, cellules utérines) ont montré que pour un même stade de développement, les embryons cocultivés avaient un nombre de cellules plus élevé et les cellules de leur bouton embryonnaire adhéraient plus les unes aux autres, comparé aux embryons obtenus en milieu simple. Les supports cellulaires utilisés en embryologie

humaine regroupaient des cellules d'origine génitale (cellules de la granulosa, cellules utérines ou cellules tubaires), des cellules provenant de lignées établies extragénitales, notamment les cellules de la lignée Vero (cellule épithéliale de reins de singe). Ces derniers types cellulaires ont permis d'obtenir 61 % de blastocystes contre 33 % en milieu B2 de Ménézo.

L'arrêté du 12 janvier 1999, relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques en assistance médicale à la procréation, précise que seule la culture sur cellules autologues (cumulus, granulosa, endomètre de la patiente) n'induit pas de risques infectieux exogènes. L'usage des cellules d'une autre patiente est strictement interdit. L'utilisation des cellules Vero est déconseillée car elles n'ont fait l'objet d'aucune procédure de validation au regard de la sécurité sanitaire, en l'état de la législation actuelle.

- **Culture prolongée en milieux séquentiels** : les systèmes de coculture ont permis d'améliorer les connaissances sur les besoins métaboliques des embryons permettant ainsi le développement de milieux de culture appropriés pour chaque stade de développement. La culture en milieu séquentiel consiste à utiliser 2 ou 3 milieux successivement au cours de la culture. Avant l'activation du génome embryonnaire, un milieu de culture simple suffit pour la fécondation et le développement des jeunes embryons jusqu'à J3. Après l'activation génomique, à partir de J3, un milieu de culture riche est nécessaire jusqu'à J6. Alors que la coculture (technique lourde) s'adressait en priorité aux couples de mauvais pronostic, la culture en milieux séquentiels (technique simple) est à proposer en priorité, aux couples de bon pronostic dans le but d'éviter les grossesses multiples.

➤ *Indications*

- **Obtention de grossesse unique** : le taux d'implantation plus élevé des blastocystes autorise un transfert numériquement plus faible sans altération des résultats. La culture prolongée des embryons permet de limiter l'incidence des grossesses multiples de haut rang. Cela est particulièrement intéressant pour les femmes ayant un utérus malformé ou de petite taille.
- **Échecs répétés de transfert à J2** : pour les patientes n'ayant pas obtenu de grossesses après au moins 3 transferts d'embryons d'assez bonne qualité, à J2, le transfert de blastocystes permet de retrouver un taux de grossesse clinique par transfert satisfaisant.

- **Analyse de l'aptitude au développement des embryons** : lorsqu'un problème de qualité ovocytaire est suspecté, la culture prolongée permet d'apprécier l'aptitude des zygotes au développement. Une influence paternelle peut aussi avoir des effets délétères sur le développement embryonnaire préimplantatoire. De plus, la culture permet une sélection cytogénétique des embryons (la moitié des embryons bloqués *in vitro* sont porteurs d'anomalies cytogénétiques).
- **Congélation des embryons** : lorsque certains embryons ne répondent pas aux critères nécessaires pour être congelés à J2 (retard important de clivage, fragmentation cellulaire supérieure à 30%), ils peuvent être cultivés jusqu'au stade de blastocyste et être ainsi congelés à ce stade tardif. Cependant la congélation de blastocyste donne de moins bons résultats qu'à J2. D'une façon générale, la culture prolongée permet de sélectionner les meilleurs embryons à congeler ; elle diminue ainsi le nombre total d'embryons cryopréservés.

## IV. LE STRESS OXYDATIF

### 1. INTRODUCTION

Le métabolisme de l'oxygène, indispensable aux organismes supérieurs, représente un véritable paradoxe. A la fois essentiel pour leur survie, il est potentiellement délétère à l'égard de leur existence. Le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit de manière continue de faibles quantités de dérivés actifs de l'oxygène (DAO). Le rôle physiologique de cette production basale de DAO n'est pas totalement connu, mais certaines de ces molécules ont une fonction dans les processus de signalisation cellulaire. La production de DAO, lors du métabolisme normal de l'oxygène par la cellule, est l'objet d'une régulation s'exerçant entre les réactions oxydatives d'une part, et les systèmes de défense antioxydants d'autre part représentés par, les piègeurs de radicaux libres oxygénés (ou *scavengers*), certaines voies métaboliques et les chélateurs de DAO. Le stress oxydatif apparaît lorsque les systèmes de défense antioxydants sont débordés, c'est-à-dire lorsque l'équilibre entre les réactions prooxydantes et antioxydantes est rompu en faveur des premières, soit par augmentation de la production de radicaux libres, soit par diminution des défenses antioxydantes. Ce déséquilibre est à l'origine d'altérations des structures protéiques, lipidiques (peroxydation lipidique),

glucidiques, ainsi que nucléotidiques. Outre ces lésions directes, les radicaux libres sont responsables de lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des produits libérés, notamment lors de la peroxydation lipidique, qui en se liant à l'ADN, vont former des adduits responsables de mutagenèse et de carcinogenèse.

## 2. RADICAUX LIBRES ET LIEUX DE PRODUCTION

### 2.1. Définition

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) dont un ou plusieurs électrons sont célibataires sur l'orbitale externe. Chaque atome est formé de deux éléments : un noyau, formé de protons et de neutrons, et des électrons qui gravitent autour du noyau et prenant place, selon les lois de la physique, sur les orbitales. Sur la première orbitale, il ne peut y avoir que deux électrons ; sur la deuxième, seulement huit. Pour qu'il y ait des électrons sur une orbitale, toutes les orbitales inférieures doivent être complètes. Dans un radical libre, le nombre d'électrons sur la dernière orbitale est impair.

Nombre d'électrons sur chaque orbitale					
Orbitale	1	2	3	4	5
Nombre d'électrons	2	8	8	18	18

Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. La probabilité de chacune des possibilités dépend essentiellement de la stabilité du radical libre considéré. Si cette instabilité est modérée, la probabilité d'accepter un second électron est grande et, dans ce cas, le radical libre ne représente qu'une étape transitoire dans une réaction d'oxydoréduction classique. Si au contraire cette instabilité est importante, l'électron libre est rapidement transféré sur une autre molécule. Plus cette instabilité est grande, moins la réaction est spécifique. En d'autres termes, l'électron passe sur une molécule non prévue à cet effet. Parmi ces molécules, certaines deviennent très réactives vis-à-vis de l'oxygène et subissent une oxydation définitive. Pour autant, le caractère radicalaire de la molécule ne disparaît pas et l'électron libre peut passer sur d'autres molécules, entraînant des phénomènes d'oxydation en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique.

Pour arrêter cette réaction en chaîne, certaines molécules sont capables de céder un de leurs électrons. La molécule radicalaire acceptant ce second électron perd son caractère radicalaire. En revanche, la molécule ayant perdu un seul électron devient radicalaire et peut théoriquement générer une nouvelle réaction en chaîne. Toutefois, si cette nouvelle espèce radicalaire est relativement stable, elle va avoir le temps de compléter sa réaction d'oxydoréduction soit en se régénérant (en regagnant un électron) soit en s'oxydant (en perdant un deuxième électron). En impliquant un électron libre dans une réaction d'oxydoréduction classique, ces molécules diminuent les phénomènes d'oxydation en chaîne et sont qualifiés de piègeurs de radicaux (*scavengers*, dans la littérature internationale) (Figure IV.1.).

Les DAO présentant une toxicité cellulaire directe sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $\bullet OH$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

## 2.2. Lieux de production

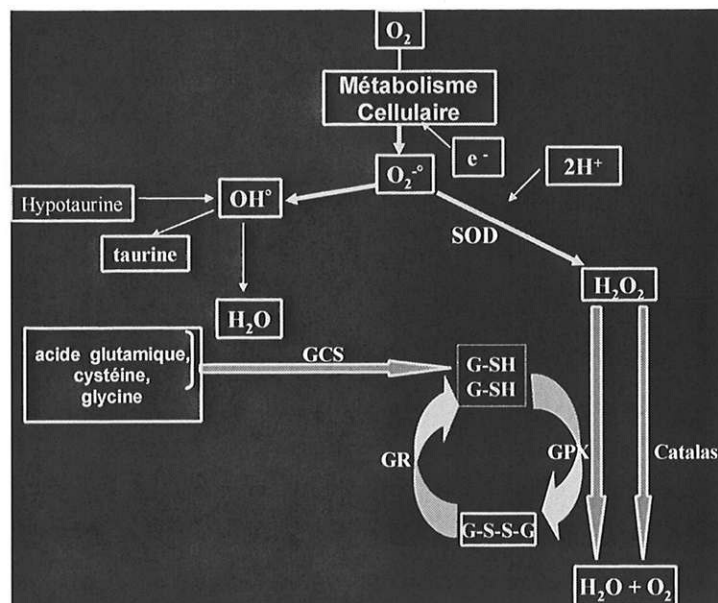
Les radicaux libres oxygénés sont continuellement produits *in vivo* et principalement au niveau de la chaîne mitochondriale de transport des électrons. Cette production mitochondriale dépend de la disponibilité en oxygène. Elle augmente avec la pression partielle en oxygène et diminue lorsque celle-ci baisse. De plus, cette production radicalaire varie selon l'activité métabolique des mitochondries puisque la majorité des auteurs rapportent que la diminution du potentiel de membrane mitochondriale s'accompagne d'une diminution de la production radicalaire. Physiologiquement, les protéines appartenant à la famille des UCP (pour *uncoupling protein*) récemment découvertes dans certains types de mitochondries et capables de diminuer ce potentiel de membrane mitochondrial, pourraient jouer un rôle dans la régulation de la production mitochondriale de radicaux libres.

Bien que cette production radicalaire mitochondriale ait été largement étudiée *in vitro*, on ne connaît pas réellement son rôle physiologique et il n'est pas clairement établi qu'elle soit susceptible de varier significativement pour être, en soi, à l'origine d'une pathologie particulière. En revanche, il est possible qu'au décours d'agressions cellulaires graves, les mitochondries soient secondairement endommagées et produisent alors des quantités importantes de radical superoxyde. La superoxyde dismutase (SOD) manganèse est une enzyme qui détoxique les DAO mitochondriaux. Un polymorphisme génétique de cette enzyme est à l'origine d'une forme moins active. En hépatologie, des patients présentant une cirrhose ont un risque 2 à 3 fois plus élevé de développer un carcinome hépato-cellulaire

lorsqu'ils présentent la forme variante de la SOD manganèse, donc une insuffisance de détoxification des DAO. Ce constat permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle la sensibilité des patients à un facteur oxydatif exogène puisse également dépendre d'un tel polymorphisme génétique.

En complément de cette production de radical superoxyde localisée au niveau de la chaîne respiratoire, d'autres réactions biochimiques participent à la genèse du stress oxydatif : les cellules phagocytaires (polynucléaires et macrophages) possèdent une enzyme membranaire, la NADPH oxydase, qui est spécialisée dans la fabrication du radical superoxyde. Cette enzyme normalement dormante est activée lorsque la cellule phagocytaire est stimulée entraînant une forte consommation d'oxygène. Cette production de superoxyde est à l'origine de la synthèse de molécules comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou l'hypochlorite ( $ClO^-$ ), indispensables à la destruction du matériel phagocyté. Cette voie de production de dérivés réactifs de l'oxygène est particulièrement stimulée au cours des processus infectieux et participe certainement au stress oxydatif pouvant compliquer ces états.

Les ions métalliques, comme le fer et le cuivre, sont de remarquables promoteurs de processus radicalaires *in vitro*. Ils accélèrent la peroxydation lipidique. En situation physiologique, la concentration libre de fer ou de cuivre est particulièrement basse, ces métaux étant séquestrés par des protéines spécialisées, de sorte que cette réaction n'a pas lieu. En revanche, les destructions cellulaires (hémolyse, rhabdomyolyse, cytolysse hépatique etc) entraînent une libération de ces métaux pouvant engendrer un stress oxydatif.



**Figure IV.1.** Métabolisme de l'oxygène et défenses antioxydantes (d'après Thibault)



### 3. ROLE DU STRESS OXYDATIF DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

#### 3.1. Dérivés actifs de l'oxygène et infertilité masculine

Le spermatozoïde constitue la cible privilégiée du stress oxydatif au sein de l'appareil reproducteur masculin (Agarwal et al., 2003). Les dommages induits par les dérivés actifs de l'oxygène sur le spermatozoïde sont irréversibles car ce dernier ne possède pas de systèmes enzymatiques cytoplasmiques réparateurs (Aitken et al., 1989).

Par ailleurs, la méta-analyse réalisée par Agarwal et al., met en évidence, de manière significative, une corrélation négative entre les taux de DAO dans le sperme et le taux de fécondation en FIV (Agarwal et al., 2005).

##### a. Altération de la mobilité du spermatozoïde

L'augmentation du taux de DAO dans le liquide séminal a été corrélée à une diminution de la mobilité des spermatozoïdes. Une cascade d'événements aboutirait à une diminution de la phosphorylation des protéines axonémales. Ceci induirait, d'une part, une chute de la mobilité des spermatozoïdes, pouvant aller jusqu'à l'immobilisation, et d'autre part, une altération de la fluidité membranaire (Aitken *et al.* 1987 ; Aitken, 1994), entraînant une dégradation de la capacité de fusion avec l'ovocyte. Par ailleurs, la diffusion du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) au travers des membranes cellulaires permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'activité de certaines enzymes, telles que la G6PD intra cellulaire, serait inhibée par ce dernier. L'inhibition de cette enzyme, impliquée dans le métabolisme du glucose, conduit à une accumulation de glutathione oxydée et réduite induisant ainsi une diminution des défenses du système antioxydant du spermatozoïde avec peroxydation des phospholipides membranaires.

##### b. Altération de l'ADN du spermatozoïde

Deux facteurs protègent l'ADN du stress oxydatif : sa compaction et les antioxydants présents dans le plasma séminal. Des études ont montré que des spermatozoïdes exposés à de fortes concentrations de dérivés actifs de l'oxygène présentent une augmentation significative



des altérations de leur ADN à type de modifications de bases, avec apparition de sites libres sur la molécule conduisant ainsi à sa fragilisation. Ces phénomènes entraînent des délétions, des mutations, des échanges de séquences et des réarrangements chromosomiques (Duru et al., 2000). Le stress oxydatif est lié à une fréquence élevée de cassures des brins d'ADN aboutissant ainsi à sa fragmentation (Twigg *et al.*, 1998 ; Aitken et al., 2001). Yang *et al.* ont mis en évidence un taux de fragmentation de l'ADN multiplié par 4 après exposition aux DAO (Yang *et al.*, 1998). Ce phénomène est fréquemment observé chez les hommes infertiles.

### c. Apoptose

L'apoptose est un phénomène naturel se définissant comme une programmation de la mort cellulaire. Celle-ci est génétiquement déterminée et se produit dès la vie embryonnaire. A l'âge adulte, l'apoptose permet l'élimination de cellules défectueuses optimisant ainsi le fonctionnement des cellules saines au sein du tissu. Dans la fonction de reproduction, elle contrôlerait l'hyperproduction de gamètes.

L'apoptose testiculaire est régulée à la fois par des facteurs intrinsèques et extrinsèques (irradiations, chimiothérapie, exposition à des toxiques), le contrôle génétique se faisant au niveau des gènes régulateurs : gènes inducteurs (p53, Bax, Fas) et gènes suppresseurs (Bcl-2, c-kit). Le modèle animal a montré le rôle clé de l'apoptose dans la régulation de la spermatogenèse, physiologique et pathologique. Celle-ci est retrouvée à tous les stades de la spermatogenèse, au sein du testis de l'homme fertile et des patients présentant une azoospermie. De même, les spermatozoïdes éjaculés sont le siège de processus apoptotiques. Dans leur étude, Gandini et al. ont mis en évidence un niveau significativement plus élevé d'apoptose précoce des spermatozoïdes de patients infertiles comparé aux spermatozoïdes matures provenant d'un groupe contrôle de donneurs (Gandini et al., 2000). Dans la même étude, le niveau d'apoptose des spermatozoïdes matures était proportionnel au niveau de DAO dans le liquide séminal. Les spermatozoïdes possédant des marqueurs apoptotiques tels que le Fas, ainsi que des dommages de l'ADN, sont le siège d'une apoptose anormale. Celle-ci est présente notamment chez les patients ayant des paramètres spermatiques anormaux tels qu'une anomalie de la morphologie, une altération de la biochimie séminale et des altérations de l'ADN nucléaire.

### 3.2. Dérivés actifs de l'oxygène et infertilité féminine

#### a. DAO dans le liquide péritonéal

Afin de déterminer si les dérivés actifs de l'oxygène dans le liquide péritonéal constituent un facteur d'infertilité, Wang et al ont évalué les taux de DAO du liquide péritonéal dans 2 groupes de patientes (endométriase, infertilité inexplicée), comparés à un groupe contrôle de patientes ayant bénéficié d'une ligature des trompes. Ces auteurs ont mis en évidence une augmentation statistiquement significative du taux de DAO chez les patientes présentant une infertilité inexplicée comparée au groupe contrôle (Wang et al., 1997). En ce qui concerne les patientes endométriosiques, aucune différence n'a été mise en évidence par rapport au groupe contrôle. De plus, il a été constaté une association entre des taux élevés de DAO et la présence d'une infertilité inexplicée, suggérant qu'un stress oxydatif dans le liquide péritonéal puisse jouer un rôle négatif chez les patientes présentant une infertilité idiopathique.

#### b. DAO dans le liquide folliculaire et devenir en FIV

Le liquide folliculaire entourant les ovocytes jouerait un rôle crucial au cours de la fécondation et du développement embryonnaire. L'ovocyte baigne dans un environnement métaboliquement actif contenant des hormones stéroïdiennes, des facteurs de croissance, des cytokines, des cellules de la granulosa et des leucocytes. En mettant en évidence la présence de DAO dans le liquide folliculaire de patientes bénéficiant d'une FIV, Attaran et al. ont évalué leur rôle dans le devenir de la tentative. Ils ont également analysé l'impact des DAO dans le liquide folliculaire sur la maturation ovocytaire, la fécondation et la grossesse. Les femmes ayant eu une grossesse ont présenté des taux de DAO significativement plus élevés. De plus, les patientes endométriosiques ou ayant un conjoint présentant une infertilité, qui sont devenues enceintes, avaient des taux de DAO significativement plus élevés que celles qui n'ont pas eu de grossesse (Attaran et al., 2000). Ces résultats ont permis d'émettre l'hypothèse d'un effet bénéfique des dérivés actifs de l'oxygène à des concentrations basses, pouvant même constituer un marqueur prédictif potentiel d'un succès en FIV. Toutefois, un stress oxydatif a été mis en évidence dans le liquide folliculaire de patientes tabagiques. Ceci pourrait expliquer un défaut de folliculogenèse associé au tabagisme (Paszkowski et al., 2002). Les DAO agissent également en durcissant la zone pellucide de l'ovocyte avec pour conséquence, une diminution des taux d'implantation et de grossesse (Dirnfeld *et al.*, 2003).

### 3.3. Stress oxydatif et embryon

L'hyperoxie, fréquemment rencontrée dans les conditions de culture *in vitro*, augmente la production de DAO par l'embryon en stimulant l'activité enzymatique des oxydases cellulaires. Par ailleurs, le métabolisme des spermatozoïdes inséminés en FIV, ainsi que ceux en cours de lyse, constituent une source importante de DAO, en libérant le contenu de leur acrosome dans le milieu environnant. Lors d'une FIV, parmi les ovocytes fécondés, certains se développent et évoluent vers des embryons de bonne qualité. Les autres présentent des anomalies morphologiques dues à une division cellulaire inégale ou à une fragmentation cellulaire. Les embryons fragmentés ont un potentiel de développement limité et sont rarement à l'origine d'une grossesse. En effet, outre la qualité initiale de l'ovocyte et du spermatozoïde, le stress oxydatif subi par l'embryon au cours de son développement *in vitro* peut expliquer de telles anomalies de développement. Des taux élevés de DAO conduisent à des altérations de la fluidité des membranes cellulaires par peroxydation lipidique (Aitken *et al.* 1987 ; Aitken, 1994). De plus, une fragmentation de l'ADN et une initiation du processus apoptotique s'opèrent au sein des embryons fragmentés, avant le stade de blastoformation. L'ADN mitochondrial, codant pour des enzymes agissant contre le stress oxydatif, présente 4 fois plus de mutations que l'ADN nucléaire après exposition aux DAO, aboutissant ainsi à un dysfonctionnement métabolique pouvant aller jusqu'au retard voire l'arrêt du développement embryonnaire (Guerin *et Ménézo* , 2001).

Certains milieux de culture ont été incriminés dans l'apparition d'un stress oxydatif du fait de leur teneur en cuivre et en fer. Cependant l'utilisation de ces mêmes milieux n'a pas retrouvé une augmentation des altérations de l'ADN. Dans une étude menée par Agarwal *et al.*, il a été mis en évidence un effet délétère des DAO sur le développement *in vitro* des embryons ainsi que sur les taux de grossesse dans des cycles de FIV avec micro injection (ICSI : *Intra Cytoplasmic Sperm Injection*), après mesure du taux de DAO dans le milieu de culture à J1 (Agarwal *et al.*, 2003). Dans la même étude, les auteurs ont également mis en évidence au cours de cycles d'ICSI, une augmentation significative du taux de fragmentation embryonnaire à J3 dans les milieux de culture présentant des taux élevés de dérivés actifs de l'oxygène.

Au vu des différentes données de la littérature, il apparaît clairement que le stress oxydatif agit de façon néfaste, tant au niveau gamétique qu'au niveau de l'embryon, notamment lors de son développement *in vitro*. Il est alors licite de penser qu'une diminution du stress oxydatif

dans les milieux de culture embryonnaire, notamment en soustrayant l'embryon à cet environnement délétère, améliorerait sa qualité et son potentiel implantatoire.

## V. RACCOURCISSEMENT DU TEMPS D' INSEMINATION DES GAMETES EN FIV : REVUE DE LA LITTERATURE.

De nombreuses équipes ont étudié le bénéfice d'un raccourcissement du temps d'insémination des gamètes en FIV classique. Les résultats sont résumés dans le tableau 1. La majorité des équipes conclut à l'absence de variation significative du taux de fécondation entre les deux modalités d'insémination. Cependant, deux équipes ont démontré une diminution du taux de fécondation lors d'insémination courte : Lundqvist *et al.*, ont observé une diminution significative du taux de fécondation (72.5% vs 80.5%,  $P=0.02$  ; 87 cycles) (Lundqvist *et al.*, 2001) ainsi que Boone *et al.*, qui sont arrivés à la même conclusion avec un taux de fécondation diminué en insémination courte des ovocytes (70.9% vs 80.4%,  $P=0.001$ ) (Boone *et al.*, 2001). A l'inverse, Gianaroli *et al.*, ont mis en évidence une augmentation significative du taux de fécondation par une insémination courte des ovocytes (74% vs 68%,  $P=0.025$  ; 167 cycles) (Gianaroli *et al.*, 1996). En terme de qualité embryonnaire et de taux de grossesse, certains travaux ne rapportent aucun bénéfice de l'insémination courte alors que Gianaroli *et al.*, et Dirnfeld *et al.*, rapportent une amélioration significative de la qualité embryonnaire (53% vs 41%,  $P=0.01$  et 52% vs 30%,  $P<0.05$ , respectivement) et des taux de grossesse (27% vs 12%,  $P<0.05$  et 42% vs 26%,  $P<0.05$ , respectivement) en cas d'insémination courte (Gianaroli *et al.*, 1996 ; Dirnfeld *et al.*, 1999). Kattera *et al.*, mettent également en évidence une amélioration significative de la qualité embryonnaire (56% vs 31.1%,  $P<0.01$ ) avec amélioration du taux d'implantation (24.6% vs 12.1%,  $P<0.003$ ) et une augmentation du taux de grossesse (48.4% vs 28.6%,  $P<0.002$ ) après insémination courte des ovocytes (Kattera *et al.*, 2003). La littérature fait donc état, soit d'une conservation, soit d'une amélioration, des résultats obtenus en termes de bénéfices d'une insémination courte des gamètes. Ceux-ci restent donc encore à être démontrés.

**Tableau 1** : Etudes comparatives des temps d'insémination gamétique en FIV classique.

	Nombre de patientes	Nombre ovocytes inséminés	Taux de fécondation	Nombre embryons	Taux de clivage	Qualité embryonnaire	Nombre embryons par transfert	Taux de grossesse
Boone et al., 2001	20	333 (165+168)	↓	ND	=	=	ND	ND
Coskun et al., 1998	36	464 (229+235)	=	263 (128+135)	=	=	ND	=
Dirnfeld et al., 1999	158 (72+86)	1554 (732+822)	=	910 (409+501)	=	↑	2.9 ± 0.5 ; 3.2 ± 0.8	↑
Gianaroli et al., 1996	167 (85+82)	1150 (595+555)	↑	217 (107+110)	↑	=	3.1 ± 1.1	↑
Kattera et al., 2003	259 (130+129)	2305 (1105+1200)	=	1700 (813+887)	ND	↑	3	↑
Lin et al., 2000	23	211 (78+133)	=	ND	=	=	ND	ND
Lundqvist et al., 2001	87	992 (488+504)	↓	354	=	=	2	=
Plachot et al., 1986	ND	ND	ND	ND	=	=	ND	ND
Quinn et al., 1998	4	215 (114+101)	=	ND	ND	↑	ND	ND
Swenson et al., 2000	66 (35+31)	ND	=	ND	=	=	3 ± 1.3 ; 3 ± 1.1	↑

= : Pas de différence significative entre insémination courte et longue

↑ : Augmentation significative au bénéfice de l'insémination courte

↓ : Diminution significative au détriment de l'insémination courte

ND : Non disponible

## VI. QUALITE EMBRYONNAIRE ET EVOLUTION VERS LE TRANSFERT D' EMBRYON UNIQUE

### 1. INTRODUCTION

Depuis son application humaine à la fin des années 60 et la naissance en Angleterre, en 1978, du premier enfant conçu par FIV, cette technique a pris une place prépondérante dans le traitement de la stérilité et est désormais couramment pratiquée. En 2004, on estimait, de par le monde, à 1,2 millions le nombre d'enfants nés après FIV. Initialement, les taux de grossesse obtenus après transferts d'embryon unique se sont rapidement avérés être catastrophiques. L'idée d'augmenter le nombre d'embryons à transférer au cours d'un même cycle fut adoptée. Parallèlement à cette stratégie de transferts embryonnaires, les progrès accomplis en matière de stimulation ovarienne et de culture embryonnaire *in vitro*, ont rapidement abouti à une amélioration significative des taux de grossesse et d'implantation. Cependant, à côté de ces résultats encourageants, s'est posé, et se pose encore, à l'heure actuelle, le problème des grossesses multiples, notamment de rang supérieur à deux. En effet, plus d'une grossesse sur quatre obtenue par FIV est une grossesse multiple. Ces grossesses de haut rang grèvent lourdement le pronostic obstétrical des grossesses post-FIV, avec des taux élevés de prématurité, d'hypotrophie et de mortalité périnatale. Très vite, la réduction du taux de grossesse de haut rang est devenue une priorité pour les médecins et biologistes de la reproduction et les techniques ont évolué dans ce sens. Actuellement, l'un des objectifs est la diminution du nombre d'embryons à transférer évoluant ainsi vers le transferts d'embryon unique, pour diminuer de manière importante le risque de grossesses multiples tout en préservant les chances de grossesse. Ainsi, de nombreuses études ont été menées dans le but de sélectionner le meilleur embryon à transférer, ceci par l'évaluation de la qualité embryonnaire, associant à la fois une analyse morphologique et une étude de la cinétique de développement de l'embryon *in vitro*.



## **2. COMPLICATIONS DES GROSSESSES MULTIPLES**

### **2.1. Prématurité**

Elle est définie dans notre pays par un terme de grossesses entre 28 et 37 SA révolues. Avec l'évolution des techniques de réanimation néonatale, elle a été étendue à l'ensemble des enfants nés viables (terme supérieur à 25 SA et/ou poids de naissance supérieur à 500 g) avant 37 SA révolues. Son taux dans les grossesses post-FIV est évalué selon les séries entre 15 et 25, mais sa définition varie selon les pays.

### **2.2. Hypotrophie**

L'hypotrophie correspond à un poids de naissance trop faible par rapport au terme. En France, la répartition des poids de naissance pour un terme donné a été évaluée sur de grandes populations et son résultat exprimé en percentiles. Par définition, l'hypotrophie correspond alors à un poids de naissance inférieur au 10<sup>ème</sup> percentile pour le terme considéré. Cette définition n'est pas universelle et de nombreux pays prennent pour indicateur d'hypotrophie le taux d'enfants dont le poids de naissance est inférieur à 2500 ou 1500 g, sans tenir compte du terme. Les taux d'hypotrophie dans les grossesses post-FIV sont respectivement de 15 %, 49,6 % et 62,4 % pour les grossesses simples, gémellaires et triples contre les 10 % théoriquement attendus.

## **VII. EVALUATION DE LA QUALITE EMBRYONNAIRE**

### **1. INTRODUCTION**

Actuellement, l'évaluation de la qualité embryonnaire reste encore essentiellement basée sur des critères morphologiques. Différents paramètres ont été proposés dans le but d'une meilleure sélection embryonnaire : le clivage de l'embryon, comprenant également le clivage précoce, la taille des blastomères, l'existence d'une fragmentation et d'une multinucléation des blastomères. L'évaluation des stades embryonnaires précoces a été améliorée ces dernières



années par l'étude morphologique des pronoyaux 16 à 20 heures après l'insémination. La capacité de développement *in vitro* de l'embryon vers le stade de blastocyste a également été proposé comme un indicateur du potentiel implantatoire de l'embryon. Cependant les données de la littérature sur ce sujet sont controversées. Certains auteurs ont rapporté des taux de grossesses plus élevés après transfert de blastocystes, frais ou congelés, comparés aux transferts embryonnaires à J2 ou J3. Pour d'autres, les 2 types de transferts étaient équivalents.

## 2. CINETIQUE DE DEVELOPPEMENT DE L'EMBRYON IN VITRO ET QUALITE EMBRYONNAIRE

La plupart des informations concernant la cinétique de développement embryonnaire proviennent de l'ICSI. En effet, cette technique permet une évaluation de la maturité nucléaire et cytoplasmique de l'ovocyte après sa décoronisation. De plus, le moment de pénétration du spermatozoïde à l'intérieur de l'ovocyte est précisément connu.

Nagy et al., ont ainsi montré que la majorité des ovocytes avait expulsé leur second globule polaire 4 heures après l'injection et 2 heures seulement pour 20 % d'entre eux. Au bout de 8 heures, les pronoyaux étaient visibles dans la majorité des ovocytes fécondés (environ 80 %) et débutaient leur décondensation 16 heures après l'ICSI. À la 25<sup>ème</sup> heure, environ 20 % des ovocytes fécondés étaient clivés en 2 cellules (Nagy et al., 1994 ; 1998).

En FIV, ces délais sont rallongés en raison de la nécessité pour le spermatozoïde de traverser les différentes barrières entourant l'ovocyte (cumulus, cellules de la corona radiata, zone pellucide). Ainsi, les pronoyaux sont visibles 18 heures après l'insémination. Le premier clivage débute à la 24<sup>ème</sup> heure pour s'achever vers la 28<sup>ème</sup> heure. Toutefois, différentes études de la cinétique d'interaction des gamètes humains *in vitro* ont mis en évidence la survenue de la fécondation dans les 4 heures suivant la mise en présence des gamètes (Plachot *et al.*, 1986 ; Gianaroli *et al.*, 1996). Ces travaux montrent d'une part, qu'un nombre moyen de 15 spermatozoïdes ont pénétré le cumulus dès 15 minutes de contact gamétique et d'autre part, que 80% des ovocytes sont fécondés après 1 heure d'incubation avec les spermatozoïdes. Les résultats de ces différentes études ont permis de prendre en compte, à la fois la cinétique de clivage de l'embryon et son analyse morphologique dans l'évaluation de sa qualité. Celle-ci inclut l'observation des pronoyaux après la fécondation de l'ovocyte, l'étude du statut

zygotique à la 25<sup>ème</sup> heure ainsi que l'analyse morphologique de l'embryon jusqu'à son transfert ou sa congélation.

## **2.1. Analyse des pronoyaux**

Après s'être formé dans la région cytoplasmique proche du second globule polaire, le pronoyau femelle rejoint le pronoyau mâle au centre de l'ovocyte. Chaque pronoyau contient les précurseurs des corps nucléolaires, distribués de manière aléatoire dans le nucléoplasme. Ceux-ci, au départ petits et abondants, verront leur nombre diminué et leur taille augmentée lors de leur fusion. Ils viendront alors se positionner le long de la membrane nucléolaire permettant ainsi leur polarisation.

Cette évaluation se fait entre la 16<sup>ème</sup> et la 18<sup>ème</sup> heure après insémination des gamètes. Les pronoyaux sont considérés comme morphologiquement normaux lorsque leur membrane est bien individualisée, lorsqu'ils sont disposés au centre de l'ovocyte et que leur taille est égale. L'analyse des pronoyaux prend également en compte un certain nombre de paramètres tels que la position, la taille, l'aspect, le nombre et la distribution des nucléoles. Chaque pronoyau doit contenir trois nucléoles, polarisés ou non, ou la différence du nombre de nucléoles entre les deux pronoyaux ne doit pas excéder trois.

Une perturbation ou une asynchronie dans la formation et le développement des pronoyaux affecte sévèrement l'enchaînement des premiers stades embryonnaires. Il existe une relation entre leur morphologie et la constitution chromosomique de l'embryon. En effet, certaines aneuploïdies sont associées à des anomalies morphologiques du pronoyau.

Les scores d'évaluation des pronoyaux diffèrent selon les auteurs. Pourtant, tous s'accordent à dire que l'existence d'un même nombre de nucléoles ainsi que leur alignement au sein des deux pronoyaux favorise grandement l'implantation de l'embryon. Ainsi, Scott et al., ont mis en évidence une amélioration des taux d'implantation après avoir pris en compte le statut des pronoyaux dans l'évaluation de la qualité embryonnaire, associée à l'étude morphologique à J3 du développement embryonnaire (Scott et al., 2000 ; 2003). Tesarik et al. ont obtenu des résultats allant dans le même sens (Tesarik et al., 2000).

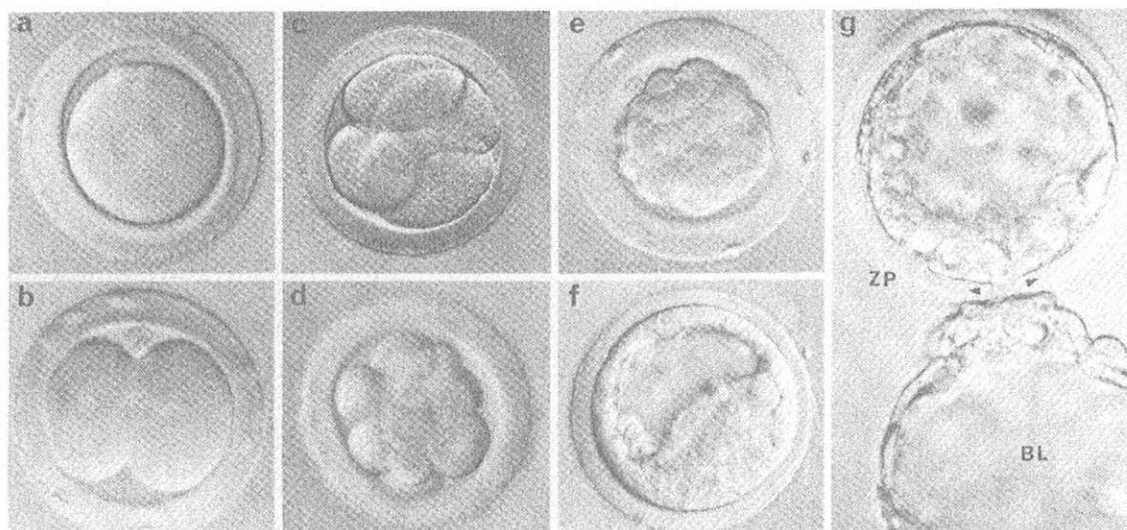
Ainsi, l'évaluation morphologique des pronoyaux, combinée à celle du clivage embryonnaire et de la fragmentation cytoplasmique, a permis une meilleure sélection des embryons à transférer.

## 2.2. Évaluation du clivage embryonnaire

Les critères les plus couramment pris en compte dans l'évaluation du clivage et de la qualité embryonnaire sont basés sur le nombre et l'uniformité des blastomères, leur taille, l'existence d'une fragmentation cytoplasmique et la présence de blastomères multinucléés.

### a. Cinétique de clivage (Figure VI.1.)

Un embryon de bonne qualité est clivé en 2 cellules à la 25e heure (clivage précoce) et doit posséder 4 blastomères à J2 et 8 à J3. Le transfert d'embryon clivé précocement augmente de manière significative le taux de grossesse. Il a été rapporté par différents auteurs qu'une croissance embryonnaire trop lente ou, à l'inverse, trop rapide avait un impact négatif sur le taux d'implantation. En effet, les transferts d'embryons possédant une cellularité différente de celle attendue à J2 ou J3 du développement embryonnaire, sont responsables d'une diminution des taux de grossesses. Un clivage embryonnaire lent voire un arrêt des divisions cellulaires, ou au contraire un clivage embryonnaire trop rapide, ont été associés à certaines anomalies chromosomiques de l'embryon telles que des mosaïques ou des aneuploïdies.



**Figure VI.1.** Cinétique de développement embryonnaire : **a)** 19 heures, une cellule ; **b)** 24 heures, deux cellules ; **c)** 35 heures, quatre cellules ; **d)** 48 heures 8-10 cellules ; **e)** 72 heures, stades morula ; **f)** 96 heures, blastocyste en formation ; **g)** 110 heures, blastocyste (BL) en éclosion hors de la zone pellucide (ZP) ; point de rupture de la zone pellucide entre les 2 pointes de flèche (*D'après La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme, C.Thibault,, Ellipses*)

## b. Taille des blastomères

Un clivage inégal de l'embryon, responsable d'une cellularité différente de celle attendue, est à l'origine d'une diminution du taux d'implantation et de grossesse après son transfert.

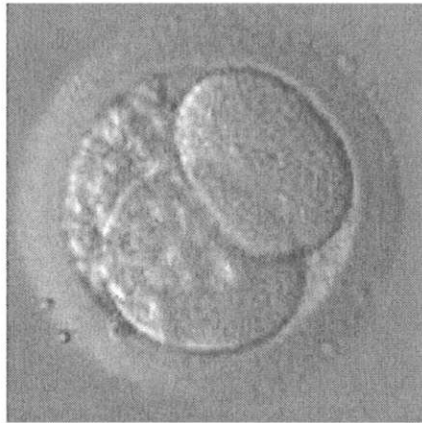
Différentes hypothèses ont été émises à ce sujet. Selon certains auteurs, le clivage inégal est dû à une distribution non homogène des organites intracellulaires, des mitochondries, de l'ARNm et des protéines. Des études récentes ont montré qu'un certain nombre de protéines et de transcrits de gènes sont polarisés dans l'ovocyte. Un clivage inégal du zygote serait ainsi à l'origine d'une perturbation de la polarité du futur embryon. Par ailleurs, des anomalies chromosomiques de nombre ont été mises en évidence dans des blastomères provenant d'embryons issus d'un clivage inégal (Hardarson et al., 2001). Les embryons à 4 cellules à J2 de développement, possèdent généralement des blastomères de taille égale à la différence des embryons ayant un nombre supérieur de blastomères (5, 6 voire 7 blastomères). L'asymétrie cellulaire à ce stade est très probablement due à une asynchronie de clivage et non à une distribution cytoplasmique inégale des composants intracellulaires.

## c. L'existence d'une fragmentation cytoplasmique (Figure VI.2.)

L'évaluation de la qualité embryonnaire prend également en compte le pourcentage de fragments cytoplasmiques dans l'embryon. La cause de la fragmentation cytoplasmique est encore, à l'heure actuelle, peu claire et son rôle dans le développement embryonnaire reste encore mal défini. De faibles taux d'implantation ont été rapportés après transfert d'embryons fragmentés à J2. Cependant, une fragmentation cytoplasmique inférieure à 20 % n'affecte pas le développement embryonnaire. De même l'existence d'une fragmentation au sein d'un embryon dont les blastomères sont de taille égale, ne modifie ni sa viabilité ni sa qualité. Il a par ailleurs été montré que les fragments cellulaires peuvent être résorbés au sein de blastomères nouvellement clivés (Hardarson et al., 2001).

Le type de fragmentation serait également un élément important dans l'évaluation de la viabilité et de la qualité de l'embryon. En effet, le caractère spatio-temporel de la fragmentation a été relié à la capacité de l'embryon à évoluer vers le stade de blastocyste ainsi qu'à sa capacité d'implantation. Ainsi, la présence de fragments de grande taille a été associée à une diminution du développement embryonnaire alors que de petits fragments localisés

n'affectent pas le potentiel implantatoire de l'embryon (Alikani et al., 1999 ; Antczak et Van Blerkom, 1999).

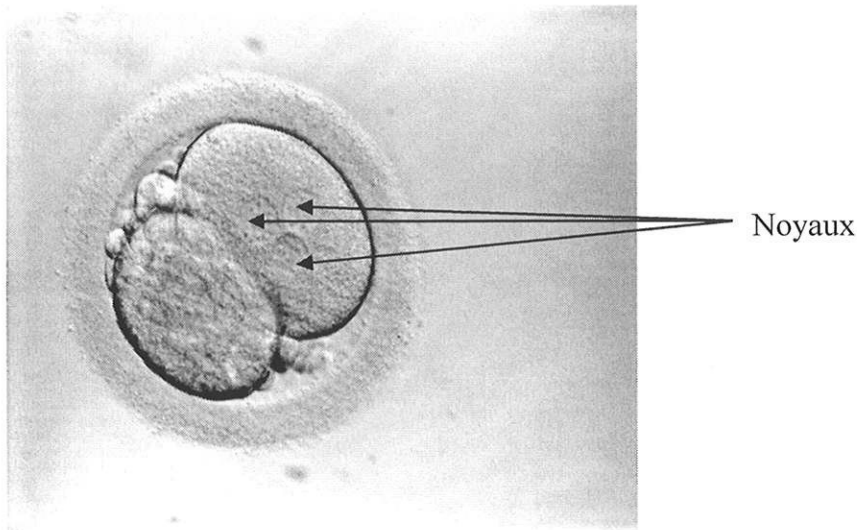


**Figure VI.2.** Fragments cellulaires au sein d'un embryon de 2 cellules (< 50% de la surface totale :  
embryon de type C2)

#### d. Statut nucléaire des blastomères

Un autre paramètre morphologique a été récemment pris en compte dans l'évaluation du pouvoir implantatoire de l'embryon, à savoir la multinucléation du blastomère (Figure VI.3.). Celle-ci est due à la présence de plus de deux noyaux fragmentés à l'intérieur d'un seul blastomère ou à un défaut de migration des chromosomes au cours de la mitose. Il a, par ailleurs, été constaté une multinucléation des blastomères dans des conditions de culture *in vitro* suboptimales. Certains auteurs ont étudié la relation qui pouvait exister entre la multinucléation des blastomères et le potentiel d'évolution et d'implantation de l'embryon. Ainsi, l'équipe de Alikani a retrouvé une baisse significative du potentiel d'évolution de l'embryon vers le stade de blastocyste (Alikani et al., 2000). Par ailleurs, un lien a été établi entre la présence d'une multinucléation et le clivage embryonnaire, les embryons possédant un nombre inégal de blastomères présentent également un taux de multinucléation plus élevé. Enfin, une corrélation positive entre la multinucléation des blastomères et le degré de fragmentation des embryons a été mise en évidence par l'équipe de Van Royen (Van Royen et al., 2003). L'analyse génétique des embryons multinucléés a retrouvé une élévation, des taux

d'aneuploïdie, des anomalies chromosomiques et un défaut dans la synthèse d'ADN, expliquant ainsi une diminution des taux de grossesses et d'implantation après leur transfert.



**Figure VI.3.** Blastomère multinucléé (3 noyaux) dans un embryon à 2 cellules.

#### e. Scores embryonnaires

De nombreux systèmes de scores embryonnaires ont été proposés par différents auteurs, reposant sur une évaluation morphologique des différents stades de développement embryonnaire *in vitro*, allant d'une analyse des signes de fécondation 18 heures après l'insémination des gamètes, à l'aspect global de l'embryon le jour du transfert, au 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> jour de développement. Ainsi, l'évaluation des pronoyaux, l'étude du statut zygotique à la 25<sup>ème</sup> heure et l'analyse morphologique de l'embryon au 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> jour de son développement, peuvent être pris en compte de manière globale dans un système de score embryonnaire permettant ainsi d'améliorer l'évaluation de la viabilité et de la qualité embryonnaire. Cependant, les critères d'appréciation de ces scores embryonnaires dépendent des conditions et des procédures biologiques propres à chaque laboratoire, ne permettant pas une standardisation de l'évaluation de la qualité embryonnaire. Pour exemple, l'équipe de Rienzi a développé un score embryonnaire dont les différents paramètres sont reportés dans le tableau suivant.



	1 <sup>er</sup> jour	2 <sup>ème</sup> jour	3 <sup>ème</sup> jour	Points
<b>Stades pronoyaux</b>	▪ Normal			0
	▪ pathologique			2
<b>Clivage précoce</b>	▪ Oui			0
	▪ non			1
<b>Clivage embryonnaire</b>		▪ 4 à 5 cellules	▪ > 6 cellules	0
		▪ 2 à 3 cellules	▪ 4 à 6 cellules	2
		▪ > 5 cellules		
		▪ < 2 cellules	▪ < 4 cellules	4
<b>Taille des blastomères</b>		▪ Égale	▪ Égale	0
			▪ inégale	1
		▪ inégale		2
<b>Fragmentation (%)</b>		▪ < 10	▪ < 10	0
		▪ 10-30	▪ 10-30	1
		▪ 30-50	▪ 30-50	2
		▪ > 50	▪ > 50	3
<b>Multinucléation (%)</b>		▪ Absente	▪ Absente	0
		▪ ≤ 50	▪ ≤ 50	2
		▪ > 50	▪ > 50	4

Rienzi et al., 2005

Ainsi, selon ce score embryonnaire, plus le nombre de points attribués à l'embryon est élevé et moins sa qualité est bonne, l'embryon de meilleure qualité ayant 0 point.

Aujourd'hui, chaque centre d'AMP évalue la viabilité et la qualité embryonnaire selon ses propres critères, plus ou moins regroupés dans un système de scores embryonnaires. Toutefois, il est clairement établi que plus les critères analysés sont nombreux et plus fine est l'évaluation de la qualité embryonnaire permettant la sélection du meilleur embryon à transférer, évoluant ainsi dans le sens de la politique du transfert d'embryon unique.



## **2<sup>ème</sup> PARTIE : NOTRE ETUDE**

## I. INTRODUCTION

Les protocoles de FIV actuels préconisent une insémination des gamètes d'environ 16 à 20 heures (Arrêté du 12/01/1999, relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques en Assistance Médicale à la Procréation (AMP), Journal Officiel n°50 du 28/02/1999). Ce délai permet d'observer les zygotes au stade de deux pronoyaux avec expulsion du 2<sup>ème</sup> globule polaire et ainsi d'attester de la survenue de la fécondation ovocytaire. Toutefois, différentes études de la cinétique d'interaction des gamètes humains *in vitro* ont mis en évidence la survenue de la fécondation dans les 4 heures suivant la mise en présence des gamètes (Plachot *et al.*, 1986 ; Gianaroli *et al.*, 1996). Ces travaux montrent d'une part, qu'un nombre moyen de 15 spermatozoïdes ont pénétré le cumulus dès 15 minutes de contact gamétique et d'autre part, que 80% des ovocytes sont fécondés après 1 heure d'incubation avec les spermatozoïdes.

Le métabolisme aérobie est à l'origine de la production de dérivés actifs de l'oxygène (DAO). Ces radicaux libres font partie de la physiologie puisqu'ils interviennent notamment dans les phénomènes de transduction du signal entre les cellules. Leur production est régulée par des systèmes de défense antioxydants qui se trouvent à la fois dans le tractus génital féminin et dans le liquide séminal. Il est très probable que l'embryon dans le milieu *in vitro* possède moins de défenses antioxydantes subissant ainsi un stress oxydatif. Ce dernier résulte de la concentration élevée en DAO, provenant du métabolisme des nombreux spermatozoïdes vivants ou en cours de lyse ainsi que l'hyperoxie, fréquemment rencontrée dans les conditions de culture *in vitro*. Il est légitime de penser que la qualité embryonnaire puisse être améliorée en diminuant le stress oxydatif subi par l'embryon notamment en le soustrayant à cet environnement délétère.

## II. OBJECTIFS DE L' ETUDE

La variabilité des résultats de la littérature en termes de bénéfices de raccourcissement du temps d'insémination des gamètes dépend certainement de la variabilité des conditions d'insémination voire des protocoles de stimulation et des qualités ovocytaires. Toujours est-il que les techniques sont différentes en puits, sous huile, les concentrations de spermatozoïdes aussi, ainsi que leurs techniques de préparation. C'est pourquoi il a été important de faire une

évaluation dans nos conditions de travail de l'impact en FIV d'un protocole d'insémination courte (3 heures) comparé à une insémination classique (18 heures). Lors d'une précédente étude, un délai d'insémination de 1 heure avait été étudié (Barraud-Lange, DESS 2003). Il avait alors été montré une amélioration non significative de la qualité embryonnaire et des taux de grossesse lors de l'insémination courte, mais surtout une baisse du taux de fécondation. C'est pourquoi nous avons augmenté le temps d'insémination jusqu'à 3 heures pour améliorer le taux de fécondation tout en bénéficiant de la réduction globale du temps de contact des gamètes. Pour cela, nous avons effectué une étude prospective comparant le taux de fécondation, le taux de fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide, la qualité embryonnaire et le taux de grossesse en fonction de la durée d'insémination. Par ailleurs, dans ce type d'étude, nous avons été les premiers à aller plus loin dans l'appréciation de la qualité embryonnaire en évaluant le statut zygotique à la 25<sup>ème</sup> heure dans les 2 protocoles d'insémination.

### **III. PATIENTES ET METHODES**

#### **1. PATIENTES**

De novembre 2004 à avril 2005, l'ensemble des couples pris en charge pour FIV dans le centre d'AMP de l'hôpital Jean Verdier a été inclus dans l'étude. Pour chaque tentative, la cohorte ovocytaire des patientes a été divisée en deux, le groupe A (groupe d'étude) qui a bénéficié d'une insémination de 3 heures et le groupe B (groupe témoin) qui a bénéficié d'une insémination de 18 heures. La répartition des ovocytes entre les 2 groupes a été de un sur deux en privilégiant le groupe d'étude en cas de cohorte ovocytaire impaire. Cette méthodologie, faisant de chaque patiente son propre contrôle, a permis d'étudier de façon élective l'effet du délai d'insémination sur des cohortes de gamètes identiques en excluant tous les autres paramètres intervenant dans la FIV. Les tentatives pour lesquelles ont été observés un échec complet de fécondation ou une absence d'ovocytes en métaphase 2 dans un des 2 groupes, ont été exclues de l'étude.

## 2. STIMULATION ET PONCTION OVARIENNES

La stimulation ovarienne a été réalisée selon 2 types de protocole :

- un protocole agoniste long, comportant une première phase de désensibilisation hypophysaire par un agoniste de la GnRH (Décapeptyl®, Ipsen S.A., France) (attestée par un taux d'oestradiol < 50 pg/ml) et une deuxième phase de stimulation par FSH recombinante (Puregon®, Organon S.A., France ; Gonal-F®, Serono S.A., France) ou un protocole court, pour lequel l'administration de l'agoniste de la GnRH est débuté 2 jours avant celle des gonadotrophines.
- un protocole antagoniste comportant une stimulation ovarienne en début de cycle par injection quotidienne de FSH recombinante (Puregon®, Organon S.A., France ; Gonal-F®, Serono S.A., France) et l'administration d'un antagoniste de la GnRH (Cétrotide®, Serono S.A., France ; Orgalutran®, Organon S.A., France) lorsque le follicule dominant a atteint une taille d'environ 14 mm.

Les doses de FSH ont été adaptées aux résultats des dosages sanguins d'oestradiol, de LH et de progestérone et aux résultats des échographies ovariennes endovaginales. Le déclenchement de l'ovulation a été effectué par une injection de 10 000 unités d'hCG (Gonadotrophine Chorionique endo®, Organon S.A., France) en présence d'au moins 3 follicules de plus de 17 mm de diamètre. La ponction ovarienne écho-guidée a été réalisée, au bloc opératoire, 36 heures après le déclenchement de l'ovulation. A partir du jour de la ponction, la préparation à l'implantation a été effectuée par l'administration de progestérone (Utrogestan®, Besins-iscovesco S.A., France) 400 mg/jour, par voie orale jusqu'au transfert puis par voie vaginale. En l'absence de risque d'hyperstimulation (oestradiol < 2500 pg/ml), une injection de 2500 unités d'hCG le lendemain de la ponction et de 1500 unités 3 à 6 jours plus tard ont été prescrites.

## 3. FECONDATION IN VITRO

La préparation et l'insémination des gamètes ont été effectuées conformément à la procédure habituelle du laboratoire, mis à part la durée de l'insémination gamétique (cahier de procédures, Wolf *et al.*, 1999). Après le recueil des complexes cumulo-ovocytaires (CCO) et la préparation de sperme, chaque CCO a été déposé dans une microgoutte de 20 µl de milieu

de culture, dans une boîte de culture FIV J0-J1 sous huile, et inséminé avec 3000 spermatozoïdes mobiles. Un rinçage des CCO, 3 heures après leur insémination, a été réalisé dans le groupe A. Les CCO du groupe B ont été rincés au bout de 18 heures. Lorsque les embryons n'ont pas été transférés à J2, ils ont été remis en culture dans une goutte de 10 $\mu$ l de milieu séquentiel, jusqu'au transfert, à J3, dans les 2 groupes.

### **3.1. Préparation des boîtes de culture FIV (Figure III.3.)**

Les boîtes de culture FIV ont été préparées et incubées la veille de leur utilisation afin d'être correctement équilibrées à 37°C, sous air enrichi à 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **a. Boîte de rinçage des CCO**

En vue du rinçage des complexes cumulo-ovocytaires inséminés durant 3 heures, des gouttes de 20 $\mu$ l d'ISM1 ont été déposées dans l'ensemble d'une boîte 3004 (Falcon®, Becton-Dickinson, USA), recouvertes d'huile minérale équilibrée (Médicult, France).

#### **b. Boîte de culture FIV J0-J1**

Des gouttes de 20 $\mu$ l d'ISM1 ont été déposées à la périphérie de boîte de culture 3004 (Falcon®, Becton-Dickinson, USA). Des gouttes de 20 $\mu$ l d'ISM1 ont été déposées en dedans des gouttes périphériques, dans la même boîte de culture. La totalité des gouttes a été recouverte d'huile minérale équilibrée (Médicult, France).

#### **c. Boîte de culture FIV J1-J3**

Des gouttes de 10 $\mu$ l d'ISM1 ont été déposées à la périphérie de boîte de culture 3004 (Falcon®, Becton-Dickinson, USA). Des gouttes de 10 $\mu$ l de milieu séquentiel ont été déposées en dedans des gouttes périphériques, dans la même boîte de culture. La totalité des gouttes a été recouverte d'huile minérale équilibrée (Médicult, France).

### **3.2. Recueil ovocytaire**

Les liquides folliculaires provenant des seringues de ponction ont été examinés sous loupe binoculaire à la recherche des CCO. Ceux-ci, après avoir été rincés, ont été déposés dans une goutte de 20µl de la couronne externe de la boîte de culture FIV J0-J1 et incubés 3-4 heures, avant insémination, à 37°C et sous air enrichi à 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.3. Recueil et préparation de sperme**

Le jour de la tentative, le recueil de sperme a été effectué par masturbation, au laboratoire, après un délai d'abstinence sexuelle de 3 à 5 jours maximum. Après liquéfaction, le sperme a été préparé par centrifugation en gradient discontinu de densité (45% et 90%) (PureSperm®, Nidacon, Suède) et analysé pour les paramètres classiques du spermogramme (normes OMS). L'insémination des ovocytes, 3 à 4 heures après leur recueil, a été faite de façon à ce que la concentration finale des spermatozoïdes soit comprise entre 100 000 à 150 000 spermatozoïdes mobiles/ml, soit 3000 spermatozoïdes mobiles dans chaque microgoutte.

### **3.4. Rinçage des complexes cumulo-ovocytaires (Figure III.3.)**

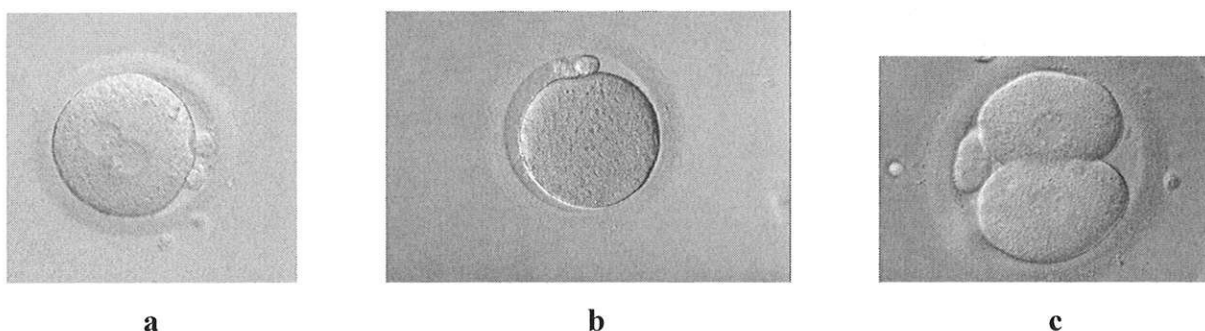
Après 3 heures d'incubation, chaque complexe cumulo-ovocytaire du groupe A a été rincé délicatement dans une goutte de 20µl d'ISM1 située dans la boîte de rinçage, par aspiration et refoulement au travers d'un cône stérile (Gilson, France), à l'aide d'une pipette réglée sur 15µl (Pipetman®, Gilson, France). Les cumulus ainsi rincés ont ensuite été déposés dans une goutte de 20µl de milieu ISM1 frais, en dedans des gouttes périphériques, dans la boîte FIV J0-J1 initiale et remis en culture dans les mêmes conditions. Les complexes cumulo-ovocytaires du groupe B ont été exposés aux spermatozoïdes pendant la durée classique d'insémination de 18 heures. Pour les 2 groupes, l'évaluation de la présence de 2 pronoyaux a été effectuée 18 heures après l'insémination, ainsi que le comptage des spermatozoïdes fixés à la zone pellucide de chaque ovocyte, après décoronisation au Stripper® (Mid-Atlantic Diagnostics, USA) et lecture au microscope inversé. A J1, après décoronisation, chaque ovocyte a été déposé dans une goutte périphérique de 10µl d'ISM1 dans la nouvelle boîte de culture FIV J1-J3. Lorsque les embryons n'ont pas été transférés à J2, ils ont été remis en culture dans une goutte de 10µl de milieu séquentiel située en dedans

des gouttes périphériques, jusqu'au transfert à J3 et congélation des embryons restants. Au total, tous les embryons ont été quotidiennement changés de milieu de culture, avec un rinçage supplémentaire des zygotes issus du protocole d'insémination courte.

#### 4. QUALITE EMBRYONNAIRE

L'évaluation de la qualité embryonnaire a été effectuée en considérant, à la fois, la cinétique de développement et la morphologie embryonnaire.

La cinétique de développement embryonnaire a pris en compte le statut zygotique à la 25<sup>ème</sup> heure (zygote à 2PN, zygote syngamique, zygote clivé) (Figure III.1.) et le nombre de blastomères au 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> jour de développement. La cinétique idéale a été définie comme étant celle pour laquelle un ovocyte vu fécondé à J1, a présenté un clivage à 2 cellules à la 25<sup>ème</sup> heure et un nombre de blastomères égal à 4, à J2, et à 8, à J3.

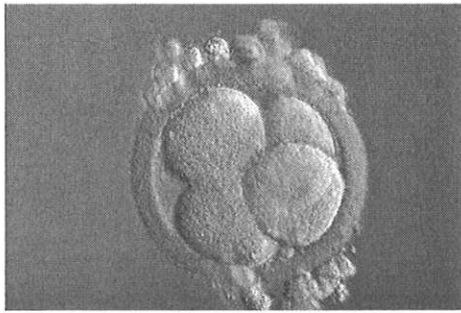


**Figure III.1.** Statut zygotique à la 25<sup>ème</sup> heure : a) stade 2 PN ; b) stade syngamique ; c) stade clivé

La morphologie embryonnaire a été évaluée selon une classification basée sur 2 critères :

- le pourcentage de fragments cellulaires présents dans l'embryon :
  - 0 % de fragmentation cellulaire : embryon type A
  - 1 à 20 % de fragmentation cellulaire : embryon type B
  - 21 à 50 % de fragmentation cellulaire : embryon type C
  - 50 % de fragmentation cellulaire : embryon type D
- l'aspect des blastomères constituant l'embryon (régularité, homogénéité, taille, blastomères multinucléés, ...) (Figure III.2.)

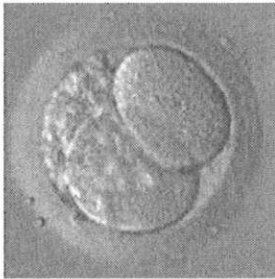




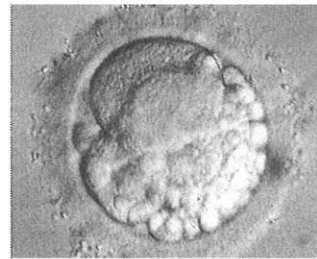
**a**



**b**



**c**

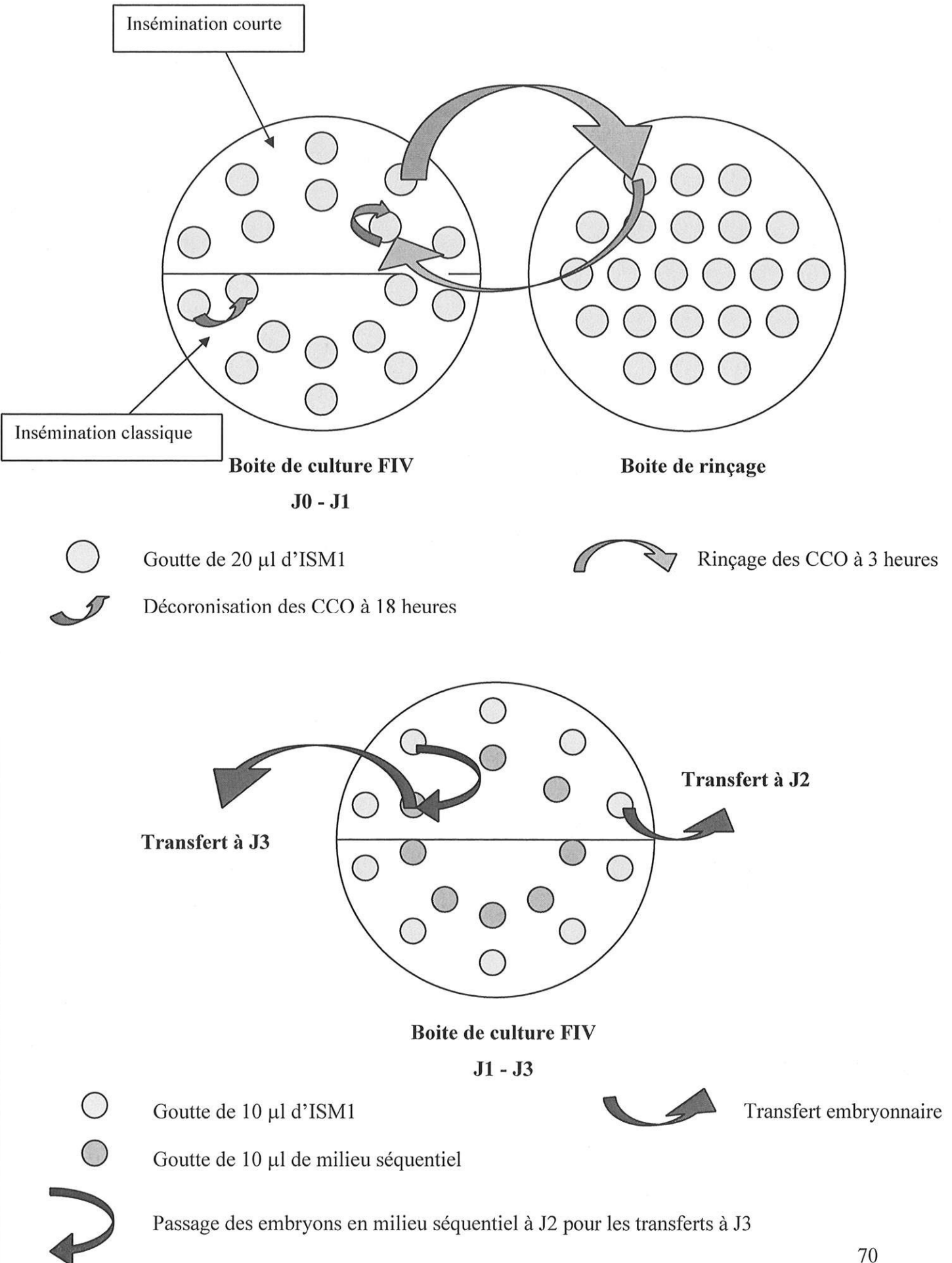


**d**

**Figure III.2.** Morphologie embryonnaire selon le score ABCD : **a)** embryon de type A4 ; **b)** embryon de type B4 ; **c)** embryon de type C2 ; **d)** embryon de type D2

Au total, les embryons de type A et de type B ayant respecté la cinétique de développement ont été considérés comme étant de bonne qualité. Le taux d'embryons de bonne qualité a été comparé entre les groupes A et B, pour toutes les patientes ayant obtenu au moins un embryon dans chacun des 2 groupes.

**Figure III.3.** Procédure d'insémination courte et longue en FIV classique



## 5. TRANSFERT

Les transferts embryonnaires ont été effectués après 2 ou 3 jours de culture *in vitro*. Les embryons transférés ont été choisis en privilégiant la qualité embryonnaire, quel que soit le groupe auquel ils appartenaient. Ainsi, trois catégories de transferts ont été individualisées : I : transferts homogènes d'embryons issus du groupe A ; II : transferts homogènes d'embryons issus du groupe B ; III : transfert mixte d'embryons issus des groupes A et B. Un dosage de  $\beta$ -hCG plasmatiques a été effectué 10 à 12 jours après le transfert embryonnaire afin d'objectiver la survenue d'une grossesse. Nous nous sommes intéressés qu'aux transferts homogènes.

## 6. ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats des deux méthodes ont été comparés à l'aide de modèles de régression généralisés utilisant des *generalized estimating equations (GEE)*, qui permet d'étudier les corrélations entre les techniques d'insémination et leurs résultats tout en tenant compte de la taille des cohortes ovocytaires de chaque patiente. Les données sont présentées en moyenne (écart-type). Les taux de fécondation et les taux moyens de fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide ont été respectivement comparés par un test exact de Fischer et un test de Wilcoxon apparié. Un seuil de significativité a été retenu pour un  $P < 0,05$ . Ces analyses statistiques ont été réalisées en collaboration avec le Dr Raphaël Porcher et son équipe, dans le service de Biostatistique et d'Informatique Médicale au CHU Saint-Louis de Paris.

## IV. RESULTATS

Un total de 59 patientes, âgées de  $34.0 \pm 4.4$  ans, a été inclus dans l'étude. Les étiologies de l'infertilité des couples étaient respectivement, tubaires dans 58 % des cas, échecs d'insémination intra-utérine dans 17 % des cas, endométriosiques dans 15 % des cas, FIV avec sperme de donneur dans 3 % des cas et dysovulatoires dans 2 % des cas.

Un total de 578 ovocytes résultant de 60 cycles de FIV a été analysé en fonction du temps de contact gamétique. Le nombre d'ovocytes attribués aux groupes A (insémination courte) et B (insémination longue) était, respectivement, de 290 et 288. Nous n'avons pas mis en évidence de diminution statistiquement significative du taux de fécondation par ovocytes mature dans le groupe A par rapport au groupe B ( $65.3 \pm 24.4\%$  vs  $71.5 \pm 25\%$  ;  $P = 0.14$ ). Il n'existait pas de différence statistiquement significative en termes de taux moyen de fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide entre les 2 groupes malgré une tendance à une plus faible fixation dans le groupe A ( $3.9 \pm 4.5$  vs  $5.6 \pm 5.4$  ;  $P = 0,16$ ).

**Tableau 2 :** Taux de fécondation et de fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide (ZP) en fonction du temps d'exposition des gamètes.

	Groupe A	Groupe B	P
Ovocytes par tentative	$4.8 \pm 2.7$	$4.8 \pm 2.6$	NS
Ovocytes matures	$3.8 \pm 2.5$	$3.7 \pm 2.2$	NS
Taux de fécondation (%)	$65.3 \pm 24.4$	$71.5 \pm 25$	0.14
Taux de fixation à la ZP (%)	3.9 (4.5)	5.6 (5.4)	0.16

En ce qui concerne les différents paramètres retenus dans notre étude pour explorer la qualité embryonnaire, à savoir, la cinétique de développement et la morphologie embryonnaire, aucune différence significative n'a été mise en évidence (Tableau 3). En effet, à la 25<sup>ème</sup> heure, les taux de zygotes à 2PN, syngamiques et clivés étaient comparables dans les groupes A et B (zygotes 2PN :  $66 \pm 35\%$  vs  $65 \pm 38\%$  ; zygotes syngamiques :  $26 \pm 34\%$  vs  $25 \pm 33\%$  ; zygotes clivés :  $8 \pm 14\%$  vs  $10 \pm 24\%$ ). Le taux d'embryons A ou B dans les deux groupes (J2 :  $66 \pm 38\%$  vs  $64 \pm 40\%$  ; J3 :  $58 \pm 40\%$  vs  $52 \pm 42\%$ ) ainsi que le taux d'embryons de bonne qualité (J2 :  $35 \pm 38\%$  vs  $33 \pm 39\%$  ; J3 :  $21 \pm 30\%$  vs  $17 \pm 28\%$ ) étaient comparables.

**Tableau 3 :** Qualité et cinétique de clivage embryonnaire à la 25<sup>ème</sup> heure, à J2 et J3 en fonction du temps d'exposition des gamètes.

	Groupe A	Groupe B	P
<i>25<sup>ème</sup> heure</i>			
Nombre d'ovocytes fécondés	2.6 ± 1.5	2.7 ± 1.8	NS
zygotes 2PN (%)	66 ± 35	65 ± 38	0.98
zygotes syngamiques (%)	26 ± 34	25 ± 33	0.94
zygotes clivés 2 cellules (%)	8 ± 14	10 ± 24	0.84
<i>J2</i>			
Nombre d'embryons	2.4 ± 1.4	2.5 ± 1.7	NS
Embryons de type A ou B (%)	66 ± 38	64 ± 40	0.49
Embryons A4 ou B4 (%)	35 ± 38	33 ± 39	0.59
<i>J3</i>			
Nombre d'embryons	2.5 ± 1.4	2.6 ± 1.7	NS
Embryons de type A ou B (%)	58 ± 40	52 ± 42	0.27
Embryons A8 ou B8 (%)	21 ± 30	17 ± 28	0.72
Embryons de type A ou B ≥ 6 cellules (%)	47 ± 42	40 ± 42	0.23

À l'issue des 60 cycles de FIV, 60 transferts embryonnaires ont été effectués permettant d'obtenir au total 18 grossesses (30%). Les taux de grossesse entre les 2 populations de patientes ayant bénéficié d'un transfert homogène d'embryons, issu soit du groupe A soit du groupe B, en fonction de l'âge, ont été résumés dans les tableaux 4 et 5.

**Tableau 4 :** Grossesses cliniques.

	Grossesse clinique		P
	Non n = 42	Oui n = 18	
Age, m (s)	34.4 (4.1)	33.2 (5.2)	0.63
Nombre d'embryons transférés, m (s)	2.1 (0.7)	2.3 (0.5)	0.28
Nombre d'embryons « courts », m (s)	1.0 (0.8)	0.9 (0.7)	0.94*

\* dans un modèle de régression logistique ajusté sur le nombre d'embryons transférés  
m (s) = moyenne (écart-type)

**Tableau 5 :** Transferts homogènes courts et longs.

	<b>Transferts homogènes courts (n = 11)</b>	<b>Transferts homogènes longs (n = 16)</b>	<b>P</b>
<b>Age, m (s)</b>	34.6 (5.5)	32.1 (4.2)	0.074
<b>Nombre d'embryons transférés, m (s)</b>	1.9 (0.7)	1.8 (0.7)	0.57
<b>Grossesses cliniques, N (%)</b>	2 (18 %)	5 (31 %)	0.66
<b>Taux d'implantation, m (s) (%)</b>	9.1 (20.2 %)	19.8 (35.1 %)	0.48

m (s) = moyenne (écart-type)

## V. DISCUSSION

Nous avons étudié l'influence de la réduction du temps d'insémination des gamètes sur l'issue de la FIV classique. Nos travaux n'ont pas mis en évidence de diminution significative du taux de fécondation des ovocytes matures lorsqu'ils étaient exposés pendant trois heures aux spermatozoïdes malgré une tendance à une plus faible fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide dans le groupe A comparé au groupe B mais sans différence statistiquement significative. Nous avons par ailleurs montré qu'il n'existait pas de différence statistiquement significative concernant la cinétique de développement et la morphologie embryonnaire entre les deux groupes. Ces résultats concordent avec les données de la littérature.

Le premier but de notre étude était de vérifier l'équivalence voire la supériorité du taux de fécondation après insémination courte de 3 heures comparée à l'insémination classique. En effet, l'ensemble des données disponibles dans la littérature rapporte que la fécondation de l'ovocyte serait un événement survenant précocement après contact avec des spermatozoïdes capacités (Plachot et al., 1986). Les résultats de nos travaux sont en accord avec ceux des équipes n'ayant pas montré de variation significative du taux de fécondation entre les deux modalités d'insémination avec, tout de même, une diminution constante de fécondation lors d'une insémination courte (Coskun et al., 1998 (59% vs 64%) ; Dirnfeld et al., 1999 (56% vs 61%) ; Lin et al., 2000 (79% vs 87%) ; Swenson et al., 2000 (66% vs 70%)). Cependant la



méthodologie choisie par ces auteurs a été différente de la nôtre, malgré des conclusions similaires. Celle que nous avons retenue (séparation en 2 de la cohorte ovocytaire de chaque patiente) nous a permis de constituer deux groupes comparables en tout point, chaque femme étant son propre contrôle. Enfin, l'usage d'un modèle logistique permettant de tenir compte de l'effectif des patientes mais aussi du nombre d'ovocytes par patiente a augmenté considérablement la puissance statistique de l'analyse de nos résultats ; en effet chaque ovocyte issu d'une même patiente a représenté un événement à part entière.

Nous n'avons observé aucune différence significative de la qualité embryonnaire lors d'une insémination courte des gamètes, comme le rapportent certaines études (Coskun et al., 1998 ; Lin et al., 2000 ; Lundqvist et al., 2001 ; Plachot et al., 1986 ; Swenson et al., 2000). A l'inverse, d'autres équipes démontrent une amélioration du score morphologique des embryons issus d'une insémination courte des ovocytes (Dirnfeld et al., 1999 ; Gianaroli et al., 1996 ; Quinn et al., 1998). Notre hypothèse de travail était basée sur une diminution de la production de dérivés actifs de l'oxygène au voisinage du complexe cumulo-ovocytaire par son rinçage précoce, permettant ainsi d'améliorer potentiellement la qualité embryonnaire. Cette hypothèse n'a pas été vérifiée et la discordance des résultats publiés dans la littérature pourrait être liée à la variation des procédures biologiques de la FIV, proprement dite, effectuées dans les différents laboratoires d'AMP. En effet, l'étude des procédures publiées par ces équipes montre une différence à la fois du nombre des spermatozoïdes mobiles inséminés (de  $0.05 \times 10^6$  à  $4 \times 10^6$ /ml) et de leur temps d'exposition avec l'ovocyte (de 1 à 4 heures) ainsi qu'une variation du volume des milieux d'incubations des ovocytes (de 5 à 750  $\mu$ l). Ainsi, il est légitime de penser que ces différents modèles de culture cellulaire et leurs conséquences, notamment sur la production de DAO, ne sont pas comparables. Il faudrait pour cela que les procédures de FIV soient standardisées d'un laboratoire à un autre, ce qui nous semble difficilement réalisable.

La qualité embryonnaire n'est peut-être pas le témoin le plus direct des modifications induites par un raccourcissement du temps d'exposition des gamètes. En effet, les éventuels bénéfices métaboliques secondaires à une diminution de la concentration en DAO dans le milieu de culture embryonnaire n'ont pas forcément de traduction morphologique. C'est pourquoi, nous nous sommes également intéressés aux capacités implantatoires des embryons issus d'une insémination courte et longue. Cependant, la petite taille de la série (59 patientes), un faible nombre de grossesses cliniques obtenues après transferts homogènes courts (2/11) et longs (5/16) avec une majorité de transferts mixtes (33/60), ne nous a pas permis de conclure quant à la qualité implantatoire des embryons malgré une différence non significative des taux de



grossesses obtenus entre les 2 populations de patientes ayant bénéficié d'un transfert homogène avec, toutefois, une différence d'âge non significative entre les 2 groupes (tableau 5). Cette différence d'âge pourrait expliquer, en partie, le faible nombre de grossesses obtenues dans le groupe des transferts homogènes courts. À l'inverse, certaines équipes ont démontré un taux de grossesse statistiquement plus élevé dans le protocole court, en inséminant  $0.5 \times 10^6$  spermatozoïdes mobiles/ml (Gianaroli et al., 1996) et  $4 \times 10^6$  spermatozoïdes mobiles/ml (Dirnfeld et al., 1999). Il semble logique de penser que la quantité de DAO produits par les spermatozoïdes est augmentée lorsque la concentration des spermatozoïdes inséminés est élevée. Ceci pourrait expliquer le bénéfice, dans ce cas, d'un raccourcissement du temps d'insémination des gamètes à la fois sur la qualité embryonnaire et sur les taux de grossesses. La procédure de FIV appliquée dans notre laboratoire est optimisée grâce à une insémination en goutte de 20  $\mu$ l, sous huile, réunissant ainsi toutes les conditions tensioactives et de température, de 100 000 à 150 000 spermatozoïdes mobiles progressifs par ml. Un changement des milieux de culture embryonnaire est effectué à J2 et J3. Cette concentration est donc 3 à 40 fois plus faible que celle utilisée par les équipes rapportant une amélioration de l'issue de la FIV en insémination courte (Gianaroli et al., 1996 ; Dirnfeld et al., 1999). Ainsi, il est permis d'envisager que la procédure standard appliquée dans notre laboratoire, comparée à ces études, diminue la concentration de DAO dans les milieux de culture embryonnaire. Le nursing embryonnaire réalisé en changeant plusieurs fois de milieux de culture entre le jour de l'insémination et le jour du transfert embryonnaire, ne laisse pas le temps à l'embryon de subir un éventuel stress oxydatif. Ainsi, le raccourcissement du temps d'exposition des gamètes, dans ces conditions, n'améliore pas nos résultats.

## VI. CONCLUSION

En augmentant le temps d'insémination jusqu'à 3 heures, nous avons effectivement augmenté le taux de fécondation, comparé au délai d'insémination courte d'une heure, évalué lors d'une précédente étude, puisqu'il est comparable à celui obtenu en 18 heures d'insémination. Mais l'amélioration de la qualité embryonnaire n'apparaît pas suffisamment déterminante dans nos conditions d'insémination pour que le délai court soit intéressant. De plus, l'analyse du taux d'implantation et du taux de grossesse dans les 2 groupes ne peut être

faite qu'au cours d'une étude semblable prolongée ne comportant que des transferts homogènes. Cela est impossible pour des raisons éthiques.

Au total, au terme de cette étude, nous avons décidé de ne plus poursuivre l'insémination courte des gamètes durant 3 heures, en FIV classique, dans nos conditions de travail.

## BIBLIOGRAPHIE

Adham I.M., Nayernia K., gel W.- Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization.- *Mol Reprod Dev.*, 1997, 46, p. 370-376

Agarwal A., Saleh R., Bedaiwy M.- Role of reactive oxygene species in the pathophysiology of human reproduction.- *Fertil Steril.*, 2003, 79, 4, p. 829-843

Agarwal A., Allamaneni S., Nallella K., et al.- Correlation of reactive oxygene species levels with the fertilization rate after in vitro fertilization: a qualified meta-analysis.- *Fertil Steril.*, 2005, 84, 1, p. 228-231

Aitken RJ., Clarkson JS.- Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygene species by human spermatozoa.- *J Reprod Fertil.*, 1987, 81, 2, p. 459-469

Aitken RJ., Clarkson JS., Fishel S.- Generation of reactive oxygene species, lipid peroxidation, and human sperm function.- *Biol Reprod.*, 1989, 40, p. 183-197

Aitken RJ.- A free radical theory of male infertility.- *Reprod Fertil Dev.*, 1994, 6, 1, p. 19-23

Aitken RJ., Krausz C.- Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome.- *Reproduction.*, 2001, 122, p. 497-506

Alikani M., Cohen J., Tomkin G., et al.- Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation.- *Fertil Steril.*, 1999, 71, p. 836-842

Alikani M., Calderon G., Tomkin G., et al.- Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in vitro.- *Hum Reprod.*, 2000, 15, p. 2634-2643

Almeida EA., Huovila AP., Sutherland AE., et al.- Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor.- *Cell*, 1995, 81, p.1095-1104

Antczak M., Van Blerkom J.- Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains.- *Hum Reprod.*, 1999, 14, p. 429-447

Attaran M., Pasqualotto E., Falcone T., et al.- The effect of follicular reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization.- *Int J Fertil Wom Med.*, 2000, 45, p. 314-320

Bazzoni G., Hemler M.E. - Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized?- *Trends Biochem. Sci.*, 1998, 23, p.30-34.

Berditchevski F., Odintsova E., Sawada S., et al.- Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling.- *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, p.36991-37000

Boone WR., Johnson JE.- Extending the coincubation time of gametes improves in vitro fertilization.- *J Assist Reprod Genet.*, 2001, 18, 1, p.18-20

Bronson RA., Fusi F.- Evidence that an Arg-Gly-Asp adhesion sequence plays a role in mammalian fertilization.- *Biol Reprod.*, 1990, 43, p. 1019-1025

Campbell S., Swann HR., Seif MW., et al.- Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo.- *Hum Reprod.*, 1995b, 10, p.1571-1578.

Charrin S., Manie S., Billard M., et al.- Multiple levels of interactions within the tetraspanin web. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 304, p.107-112.

Chen H., Sampson NS.- Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg alpha 6 beta1 integrin is the receptor for sperm fertilin beta.- *Chem. Biol.*, 1999, 6, p.1-10.

Chen MS., Tung KS., Coonrod SA., et al.- Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha 6 beta1: implications for murine fertilization.- *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96, p.11830-11835

Cherr GN., Lambert H., Meizel S., et al.- In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous solubilized zonae pellucidae.- *Dev Biol.*, 1986, 114, p. 119-131

Coskun S., Roca GL., Elnour AM., et al.- Effects of reducing insemination time in human in vitro fertilization and embryo development by using sibling oocytes.- *J Assist Reprod Genet.*, 1998, 15, 10, p.605-608

Dadoue J.P.- *Histologie.*-2ème éd.- Paris : Flammarion, 2000.- 319 p.- (Collection Médecine-Sciences)

Degoul F., Sutton A., Mansouri A., et al.- Homozygosity for alanine in the mitochondrial targeting sequence of superoxide dismutase and risk for severe alcoholic liver disease.- *Gastroenterology*, 2001, 120, 6, p.1468-74

De Nadai C., Fenichel P., Donzeau M., et al.- Characterization and role of integrins during gametic interaction and egg activation.- *Zygote*, 1995, 4, p. 31-40

Deng X., Czymbek K., Martin-deLeon P.A.- Biochemical maturation of Spam 1 (PH-20) during epididymal transit of mouse sperm involves modifications of N-linked oligosaccharides.- *Mol Reprod Dev.*, 1999, 52, 196-206

Dirnfeld M., Bider D., Koifman M., et al.- Shortened exposure of oocytes to spermatozoa improves in-vitro fertilization outcome: a prospective, randomized, controlled study.- *Hum Reprod.*, 1999, 14, 10, p.2562-2564

Dirnfeld M., Shiloh H., Bider D., et al.- A prospective randomized controlled study of the effect of short coincubation of gametes during insemination on zona pellucida thickness.- *Gynecol Endocrinol.*, 2003, 17, p.397-403

Duru NK., Morshedi M., Oehninger S.- Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa.- *Fertil Steril.*, 2000, 74, p. 1200-1207

Encha - Razavi F., Escudier E. – Embryologie humaine : De la molécule à la clinique.- 2<sup>ème</sup> éd.- Paris : Masson, 2000.- 300 p.- (Collection Abrégés)

Evans JP., Schultz RM., Kopf RS.- Identification and localization of integrin subunits in oocytes and eggs of the mouse. *Mol Reprod Dev.*, 1995a, 40, p. 211-220

Evans JP., Kopf GS., Schultz RM.- Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin beta subunit to mouse eggs: evidence for adhesive activity via an egg beta1 integrin-mediated interaction.- *Dev. Biol.*, 1997, 187, p.79-93

Evans JP. - Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions.- *Front Biosci.*, 1999, 4, p.114-131

Fakan S., Wallace L.R., Odartchenko N.- Localization of the paternal genome in early mouse embryos by electron microscope autoradiography.- *J. Microsc. Biol. Cell.*, 1976, 27, p.19-24

Feng Y., Broder CC., Kennedy PE., et al.- HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor.- *Science*, 1996, 272, p. 872-877

Fitter S., Sincock PM., Jolliffe CN., et al.- Transmembrane 4 superfamily protein CD151 (PETA-3) associates with beta 1 and alpha IIb beta 3 integrins in haemopoietic cell lines and modulates cell-cell adhesion.- *Biochem. J.*, 1999, 338, p.61-70

Fusi FM., Vignali M., Busacca M., et al.- Evidence for the presence of an integrin cell adhesion receptor on the oolemma of unfertilized human oocytes.- *Mol. Reprod. Dev.*, 1992, 31, p.215-222

Fusi FM., Vignali M., Gailit J., et al.- Mammalian oocytes exhibit specific recognition of the RGD (Arg-Gly-Asp) tripeptide and express oolemmal integrins.- *Mol Reprod. Dev.*, 1993, 36, p. 212-219

Gandini L., Lombardo F., Paoli D., et al.- Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa.- *Hum Reprod.*, 2000, 15, p. 830-839



Gianaroli L., Cristina Magli M., Ferraretti AP., et al.- Reducing the time of sperm-oocyte interaction in human in-vitro fertilization improves the implantation rate.- *Hum Reprod.*, 1996, 11, 1, p.166-171

Gianaroli L., Fiorentino A., Cristina Magli M., et al.- Prolonged sperm-oocyte exposure and high sperm concentration affect human embryo viability and pregnancy rate.- *Hum Reprod.*, 1996, 11, 11, p.2507-2511

Guerin P., El Moutassim S., Ménéz Y.- Oxydative stress and protection against reactive oxygene species in the pre-implantation embryo and its surroundings.- *Hum Reprod. Update*, 2001, 7, 2, p.175-189

Hamamah S., Ménéz Y.- Ovocyte et embryon : de la physiologie à la pathologie.- Paris : Ellipses, 1999.- 368 p.

Hardarson T., Hanson C., Sjogren A., et al.- Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation.- *Hum Reprod.*, 2001, 16, p. 313-318

Hynes RO.- Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion.- *Cell*, 1992, 69, p. 359-362

Ito Y., Yoshida H., Uruno T., et al.- KAI1 expression in thyroid neoplasms: its linkage with clinicopathologic features in papillary carcinoma. *Pathol. Res. Pract.*, 2003, 199, p.79-83

Ji YZ., Wolf JP., Jouannet P., et al.- Human gamete fusion can bypass  $\beta 1$  integrin requirement.- *Hum Reprod*, 1998, 13, 3, p. 682-689

Kaji K., Oda S., Shikano T., et al.- The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice.- *Nat. Genet.*, 2000, 24, p.279-282

Kattera S., Chen C.- Short coincubation of gametes in vitro fertilization improves implantation and pregnancy rates: a prospective, randomized, controlled study.- *Fertil Steril.*, 2003, 80, 4, p.1017-1021

Le Naour F., Rubinstein E., Jasmin C., et al.- Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice.- *Science*, 2000, 287, p.319-321

Liddington RC., Ginsberg MH.- Integrin activation takes shape.- *J. Cell Biol.*, 2002, 158, p.833-839.

Leyton L., Saling P.- 95kD sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding.- *Cell*, 1989, 57, p. 1123-1130

Lin SP., Kuo-Kuang Lee R., Su JT., et al.- The effects of brief gamete coincubation in human in vitro fertilization.- *J Assist Reprod Genet.*, 2000, 17, 6, p.344-348

Lundqvist M., Johansson U., Lundkvist Ö., et al.- Reducing the time of co-incubation of gametes in human in-vitro fertilization has no beneficial effects.- *RBM online*, 2001, 3, 1, p.21-24

Miller BJ., Georges-Labouesse E., Primakoff P., et al.- Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin  $\alpha 6 \beta 1$  and is CD9-dependent.- *J Cell Biol.*, 2000, 149, p.1289-1296

Miyado K., Yamada G., Yamada S., et al.- Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization.- *Science*, 2000, 287, p.321-324

Miyamoto S., Teramoto H., Coso OA., et al.- Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules.- *J Cell Biol.*, 1995b, 131, p. 791-805

Nagy ZP., Liu J., Joris H., et al.- Time course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection.- *Hum Reprod.*, 1994, 9, p.1743-1748

Nagy ZP., Janssenswillen C., Janssens R., et al.- Timing of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in-vitro fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa.- *Hum Reprod.*, 1998, 13, p.1606-1612

Olivennes F., Hazout A., Frydman R.- Assistance médicale à la procréation.- 2<sup>ème</sup> éd., Paris : Masson, 2002.- 194 p.

Paszkowski T., Clarke RN., Hornstein MD.- Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle.- Hum Reprod., 2002, 17, p. 921-925

Plachot M., Junca AM., Mandelbaum J., et al.- Timing of in-vitro fertilization of cumulus free and cumulus-enclosed human oocytes.- Hum Reprod., 1986, 1, 4, p.237-247

Primakoff P., Myles DG.- Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction.- Science, 2002, 296, p.2183-2185

Quinn P., Lydic ML., Ho M., et al.- Confirmation of the beneficial effects of brief coincubation of gametes in human in vitro fertilization.- Fertil Steril., 1998, 69, 3, p.399-402

Rienzi L, Ubaldi F., Iacobelli M., et al.- Significance of morphological attributes of the early embryo.- Reproductive BioMedecine Online, 2005, 10, 5, p.669-681

Sanchez-Mateos P., Cabanas C., Sanchez-Madrid F.- Regulation of integrin function.- Semin. Cancer Biol., 1996, 7, p.99-109

Schwartz MA.- Transmembrane signalling by integrins.- Trends Cell Biol., 1992, 2, p.304-308

Schwartz MA., Schaller MD., Ginsberg MH.- Integrins: emerging paradigms of signal transduction.- Annu Rev Cell Dev Biol., 1995, 11, p.549-599

Scott L., Alvero R., Leondires M., et al.- The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation.- Hum Reprod., 2000, 15, p.2394-2403

Scott L.- Pronuclear scoring as a predictor of embryo development.- Reproductive BioMedecine Online, 2003, 6, p.201-214

Serru V., Le Naour F., Billard M., et al.- Selective Tetraspan/integrin complexes (CD81/ $\alpha$ 4 $\beta$ 1, CD151/ $\alpha$ 3 $\beta$ 1, CD151/ $\alpha$ 6 $\beta$ 1) under conditions disrupting tetraspan interactions.- *Biochem. J.*, 1999, 340, p.103-111

Swenson K., Check JH., Summers-Chase D., et al.- A randomized study comparing the effect of standard versus short incubation of sperm and oocyte on subsequent pregnancy and implantation rates following in vitro fertilization embryo transfer.- *Arch Androl.*, 2000, 45, p.73-76

Takahashi Y., Bigler D., Ito Y., et al.- Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98.- *Mol. Biol. Cell*, 2001, 12, p.809-820

Tarone G., Russo MA., Hirsch E., et al.- Expression of  $\beta$ 1 integrin complexes on the surface of unfertilized mouse oocyte.- *Development*, 1993, 117, p. 1369-1375

Tesarik J., Junca AM., Hazout A., et al.- Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non invasive examination of pronuclear morphology.- *Hum Reprod.*, 2000, 15, p.1396-1399

Thibault C., Levasseur M -C.- *La reproduction chez les mammifères et l'homme.*- Paris : Ellipses, INRA, 1991.- 768 p.

Thibault C., Levasseur M -C.- *La reproduction chez les mammifères et l'homme.*- 2ème éd., Paris : Ellipses, INRA, 2001.- 928 p.

Tomeczuk M., Takahashi Y., Huang J., et al.- Role of multiple beta1 integrins in cell adhesion to the disintegrin domains of ADAMs 2 and 3.- *Exp. Cell Res.*, 2003, 290, p.68-81

Twigg J., Fulton N., Gomez E., et al.- Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants.- *Hum Reprod.*, 1998, 13, 6, p.1429-1436

Twigg J., Irvine DS., Aitken RJ.- Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection.- *Hum Reprod.*, 1998, 13, p.1864-1871

Van Royen E., Mangelschots K., Vercruyssen M., et al.- Multinucleation in cleavage stage embryos.- *Hum Reprod.*, 2003, 18, p.1062-1069

Van Wissen B., Wolf JP., Bomsel-Helmreich O., et al.- Timing of pronuclear development and first cleavages in human embryos after subzonal insemination: influence of sperm phenotype.- *Hum Reprod.*, 1995, 10, 3, p. 642-648

Vorup-Jensen T., Hjort T., Abraham-Peskir J.V., et al.- X-ray microscopy of human spermatozoa shows change of mitochondrial morphology after capacitation.- *Hum Reprod.*, 1999, 14, p. 880-884

Wang Y., Sharma RK., Falcone T., et al.- Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility.- *Fertil Steril.*, 1997, 68, p. 826-830

Wassarman P.M.- Mammalian fertilization : molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion.- *Cell*, 1999, 96, p. 175-183

Wassarman PM., Jovine L., Litscher ES.- A profile of fertilization in mammals.- *Nat. Cell Biol.*, 2001, 3, p.59-64

Ziyyat A., Rubinstein E., Monier-Gavelle F.- CD9 controls the formation of clusters containing tetraspanins and the integrin  $\alpha 6\beta 1$  involved in human and mouse gamete fusion.- *J of Cell Science*, 2005 (accepté pour parution)

Yanagimachi R.- Mammalian fertilization In “ The Physiology of Reproduction “.- Knobil E., Neill J.D. eds., 2d edition, 1994, chapter V, p. 189-317, Raven Press, N.-Y.

Yang HW., Hwang KJ., Kwon HC., et al.- Detection of reactive oxygene species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos.- *Hum Reprod.*, 1998, 13, 4, p.998-1002

Yauch RL., Berditchevski F., Harler MB., et al.- Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin alpha3beta1 with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and may regulate cell migration.- Mol. Biol. Cell., 1998, 9, p.2751-2765

Zhu X., Evans JP.- Analysis of the Roles of RGD-Binding Integrins, alpha(4)/alpha(9) Integrins, alpha(6) Integrins, and CD9 in the Interaction of the Fertilin beta (ADAM2) Disintegrin Domain with the Mouse Egg Membrane.- Biol. Reprod., 2002, 66, p.1193-1202

Zorn B., Vidmar G., Meden-Vrtovec H.- Seminal reactive oxygene species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection.- I J of Androl., 2003, 26, p. 279-285

#### **Sites internet :**

- [www.ampcochin.paris.free.fr](http://www.ampcochin.paris.free.fr)
- [www.gfmer.ch](http://www.gfmer.ch)
- [www.umr-cpma.art-solution.ch](http://www.umr-cpma.art-solution.ch)
- [www.amp-chu-besancon.univ-fcomte.fr](http://www.amp-chu-besancon.univ-fcomte.fr)
- [www.blefco.fr](http://www.blefco.fr)
- [www.chu-marseille.fr](http://www.chu-marseille.fr)
- [www.georges.dolisi.fr](http://www.georges.dolisi.fr)
- [www.chu-toulouse.fr](http://www.chu-toulouse.fr)



## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	4
SOMMAIRE.....	9
ABREVIATIONS.....	11
<b>1<sup>ère</sup> PARTIE : GENERALITES .....</b>	<b>13</b>
<b>I. PHYSIOLOGIE DE LA FECONDATION HUMAINE .....</b>	<b>14</b>
1. INTRODUCTION.....	14
2. LES ACTEURS DE LA FECONDATION.....	14
2.1. Le complexe cumulo-ovocytaire (CCO).....	14
2.2. Les spermatozoïdes .....	15
3. LES ETAPES DE LA FECONDATION .....	16
3.1. Pénétration du cumulus oophorus.....	17
3.2. La capacitation .....	17
3.3. Réaction acrosomique (RA) .....	18
a. L'acrosome .....	18
b. Aspects cytologiques .....	19
c. Aspects moléculaires.....	20
d. Inducteurs physiologiques de la réaction acrosomique.....	20
3.4. La fusion des gamètes (Wolf et al., 2005).....	23
4. ACTIVATION DE L'OVOCYTE.....	24
4.1. Changement de potentiel transmembranaire et mobilisation du calcium intracellulaire .....	25
4.2. Dégranulation des granules corticaux.....	25
4.3. Achèvement de la seconde division méiotique de l'ovocyte et expulsion du deuxième globule polaire.....	26
5. FORMATION, DEVELOPPEMENT ET MIGRATION DES PRONOYAUX..	26
5.1. Décondensation du noyau du spermatozoïde (Figure I.5.).....	26
5.2. Formation et développement des pronoyaux.....	27
5.3. Migration des pronoyaux vers le centre de l'œuf.....	27

## II. PREMIERE SEMAINE DE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

.....	29
1. LA COMPACTION DE LA MORULA .....	30
1.1. Avant la compaction .....	30
1.2. La compaction proprement dite .....	31
2. FORMATION DU BLASTOCYSTE.....	32
3. EXPANSION DU BLASTOCYSTE.....	32
4. MIGRATION DE L'EMBRYON.....	33

## III. LA FECONDATION IN VITRO : ASPECTS CLINIQUES ET

### TECHNIQUES..... 34

1. INTRODUCTION.....	34
2. ASPECTS CLINIQUES .....	35
2.1. La stimulation ovarienne.....	35
2.2. La ponction folliculaire.....	36
3. ASPECTS TECHNIQUES : DEROULEMENT D'UNE FIV AU LABORATOIRE.....	37
3.1. A J0 : Traitement des gamètes et insémination <i>in vitro</i> .....	37
a. Recueil et mise en culture des ovocytes.....	37
b. Préparation du sperme.....	37
c. L'insémination <i>in vitro</i> .....	38
3.2. A J1 : Décoronisation et observation des ovocytes.....	39
3.3. A J2 ou J3 : Observation et transfert embryonnaire.....	40
a. Observation embryonnaire .....	40
b. Transfert embryonnaire.....	40
c. Congélation des embryons .....	41
d. La culture prolongée .....	41

## IV. LE STRESS OXYDATIF ..... 43

1. INTRODUCTION.....	43
2. RADICAUX LIBRES ET LIEUX DE PRODUCTION .....	44
2.1. Définition .....	44
2.2. Lieux de production .....	45
3. ROLE DU STRESS OXYDATIF DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION.....	47

3.1. Dérivés actifs de l'oxygène et infertilité masculine .....	47
a. Altération de la mobilité du spermatozoïde .....	47
b. Altération de l'ADN du spermatozoïde .....	47
c. Apoptose .....	48
3.2. Dérivés actifs de l'oxygène et infertilité féminine .....	49
a. DAO dans le liquide péritonéal .....	49
b. DAO dans le liquide folliculaire et devenir en FIV .....	49
3.3. Stress oxydatif et embryon .....	50
<b>V. RACCOURCISSEMENT DU TEMPS D' INSEMINATION DES</b>	
<b>GAMETES EN FIV : REVUE DE LA LITTERATURE. ....</b>	<b>51</b>
<b>VI. QUALITE EMBRYONNAIRE ET EVOLUTION VERS LE</b>	
<b>TRANSFERT D' EMBRYON UNIQUE .....</b>	<b>53</b>
1. INTRODUCTION.....	53
2. COMPLICATIONS DES GROSSESSES MULTIPLES .....	54
2.1. Prématurité.....	54
2.2. Hypotrophie.....	54
<b>VII. EVALUATION DE LA QUALITE EMBRYONNAIRE.....</b>	<b>54</b>
1. INTRODUCTION.....	54
2. CINETIQUE DE DEVELOPPEMENT DE L'EMBRYON IN VITRO ET	
QUALITE EMBRYONNAIRE .....	55
2.1. Analyse des pronoyaux .....	56
2.2. Évaluation du clivage embryonnaire .....	57
a. Cinétique de clivage (Figure VI.1.).....	57
b. Taille des blastomères .....	58
c. L'existence d'une fragmentation cytoplasmique (Figure VI.2.) .....	58
d. Statut nucléaire des blastomères .....	59
e. Scores embryonnaires .....	60
<b>2<sup>ème</sup> PARTIE : NOTRE ETUDE .....</b>	<b>62</b>
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>63</b>
<b>II. OBJECTIFS DE L' ETUDE.....</b>	<b>63</b>
<b>III. PATIENTES ET METHODES.....</b>	<b>64</b>

<b>1. PATIENTES</b> .....	<b>64</b>
<b>2. STIMULATION ET PONCTION OVARIENNES</b> .....	<b>65</b>
<b>3. FECONDATION IN VITRO</b> .....	<b>65</b>
<b>3.1. Préparation des boîtes de culture FIV (Figure III.3.)</b> .....	<b>66</b>
a. Boîte de rinçage des CCO.....	66
b. Boîte de culture FIV J0-J1.....	66
c. Boîte de culture FIV J1-J3.....	66
<b>3.2. Recueil ovocytaire</b> .....	<b>67</b>
<b>3.3. Recueil et préparation de sperme</b> .....	<b>67</b>
<b>3.4. Rinçage des complexes cumulo-ovocytaires (Figure III.3.)</b> .....	<b>67</b>
<b>4. QUALITE EMBRYONNAIRE</b> .....	<b>68</b>
<b>5. TRANSFERT</b> .....	<b>71</b>
<b>6. ANALYSE STATISTIQUE</b> .....	<b>71</b>
<b>IV. RESULTATS</b> .....	<b>71</b>
<b>V. DISCUSSION</b> .....	<b>74</b>
<b>VI. CONCLUSION</b> .....	<b>76</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>78</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>88</b>

## SERMENT D'HIPPOCRATE

---

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 154

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ



## RESUME

**INTRODUCTION :** Pour améliorer les taux de grossesses en FIV tout en diminuant le risque de grossesses multiples, il y a nécessité d'améliorer la qualité embryonnaire. Les dérivés actifs de l'oxygène (DAO) peuvent avoir un effet délétère. Or il n'y a plus ou peu de défenses antioxydantes dans les milieux de culture et les DAO produits par les spermatozoïdes en surnombre peuvent entraîner un stress oxydatif. La fécondation survenant dans les quatre heures, la réduction du temps d'incubation est susceptible d'avoir un effet protecteur. Nous avons évalué l'intérêt d'une insémination courte (3 heures : groupe A) comparé à une insémination classique (18 heures : groupe B). **PATIENTES ET METHODES :** Soixante tentatives de FIV ont été incluses dans une étude prospective. Chaque cohorte ovocytaire a été distribuée de façon randomisée entre les groupes A et B. L'insémination a été réalisée dans des microgouttes de 20 µl sous huile avec 3000 spermatozoïdes mobiles par goutte. L'utilisation de milieux de rinçage et de milieux séquentiels ont permis aux embryons d'être changés au moins 3 fois de milieu. **RESULTATS :** Il n'y a pas de différence significative en termes de taux de fécondation et de qualité embryonnaire (statut zygotique à la 25<sup>ème</sup> heure, morphologie embryonnaire à J2 et J3) entre les deux groupes. Soixante transferts embryonnaires ont été effectués permettant d'obtenir au total 18 grossesses (30%). Nous n'avons pas observé de différence des taux de grossesse après transferts homogènes d'embryons issus des protocoles court et long. **CONCLUSION :** L'amélioration de la qualité embryonnaire n'apparaît pas suffisante dans ces conditions d'insémination pour que le délai court soit intéressant. L'analyse du taux d'implantation et du taux de grossesse nécessite une étude prolongée, sur des transferts homogènes. Cela est impossible pour des raisons éthiques.

**DISCIPLINE :** Médecine

**Mots clés :** stress oxydatif, dérivés actifs de l'oxygène, FIV, insémination courte, qualité embryonnaire.

**LABORATOIRE :**

Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique, Hôpital Jean Verdier AP-HP, Avenue du 14 Juillet, 93140 Bondy.