

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Médecine



ANNEE 2009

THESE N° 3108/A

**ANALYSE DESCRIPTIVE DES RÉSULTATS DE  
FÉCONDATION IN VITRO SANS ET AVEC MICRO-  
INJECTION AU LABORATOIRE D'AMP DU CHU DE  
LIMOGES DE 2003 À 2006**

**Tentative de construction d'un score embryonnaire**

**THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN  
MÉDECINE**

*Présentée et soutenue publiquement le : 10 Avril 2009*

par

**Mathilde BEGUET**

Née le 10 Janvier 1981 à Rillieux-la-Pape (69)



**EXAMINATEURS DE LA THÈSE**

Mme le Professeur Catherine YARDIN..... Président  
M. le Professeur Yves AUBARD..... Juge  
M. le Professeur Jean-Louis BENEYTOU..... Juge  
M. le Professeur Jean-Marie PREUX..... Juge

Mme le Docteur Sophie DELCLEVE-PAULHAC..... Directeur de thèse  
M. le Docteur Jean-Christophe PECH..... Membre invité  
M. le Docteur Pascal PIVER..... Membre invité

**UNIVERSITE DE LIMOGES  
FACULTE DE MEDECINE**

---

**DOYEN DE LA FACULTE:**

Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude

**ASSESSEURS:**

Monsieur le Professeur LASKAR Marc  
Monsieur le Professeur VALLEIX Denis  
Monsieur le Professeur PREUX Pierre-Marie

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:**

\* C.S = Chef de Service

ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul * (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE
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
BEDANE Christophe (C.S)	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
BERTIN Philippe (C.S)	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François (C.S)	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE 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
DANTOINE Thierry	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (Sur 31/08/2011)	PEDIATRIE
DENIS François (Sur 31/08/2011)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DESCOTTES Bernard (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION
DUDOGNON Pierre (Sur 31/08/2009)	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
DUMAS Jean-Philippe (C.S)	UROLOGIE
DUMONT Daniel (C.S)	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
ESSIG Marie	NEPHROLOGIE
FEISS Pierre (C.S)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
FEUILLARD Jean (C.S)	HEMATOLOGIE
GAINANT Alain (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION
GASTINNE Hervé (C.S)	REANIMATION MEDICALE
JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François (C.S)	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE
MABIT Christian	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MAUBON Antoine (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MERLE Louis (C.S)	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
MONTEIL Jacques	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
MOREAU Jean-Jacques (C.S)	NEUROCHIRURGIE
MOULIES Dominique (C.S)	CHIRURGIE INFANTILE
MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
PARAF François	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
PLOY Marie-Cécile	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
RIGAUD Michel (Surnombre 31/08/2010)	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
ROBERT Pierre-Yves	OPHTALMOLOGIE
SALLE Jean-Yves (C.S)	MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION
SAUTEREAU Denis (C.S)	GASTRO-ENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE
SAUVAGE Jean-Pierre (Sur 31/08/2011)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
STURTZ Franck	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
TREVES Richard	RHUMATOLOGIE
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)	CANCEROLOGIE
VALLAT Jean-Michel (C.S)	NEUROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE – CHIRURGIE GENERALE
VANDROUX Jean-Claude (Sur 31/08/2011)	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
VERGNENEGRE Alain (C.S)	EPIDEMIOLOGIE-ECONOMIE DE LA SANTE-PREVENTION
VIDAL Elisabeth (C.S)	MEDECINE INTERNE
VIGNON Philippe	REANIMATION MEDICALE
VIROT Patrice (C.S)	CARDIOLOGIE
WEINBRECK Pierre (C.S)	MALADIES INFECTIEUSES
YARDIN Catherine (C.S)	CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

#### MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel	Parasitologie et Mycologie
ANTONINI Marie-Thérèse (CS)	Physiologie
BOURTHOUMIEU Sylvie	Cytologie et Histologie
BOUTEILLE Bernard	Parasitologie - Mycologie
CHABLE Héléne	Biochimie et Biologie Moléculaire
DRUET-CABANAC Michel	Médecine et Santé au Travail
DURAND-FONTANIER Sylvaine	Anatomie – Chirurgie Digestive
ESCLAIRE Françoise	Biologie Cellulaire
FUNALOT Benoît	Biochimie et Biologie Moléculaire
JULIA Annie (Départ le 01/01/2009)	Hématologie
LE GUYADER Alexandre	Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
MOUNIER Marcelle	Bactériologie – Virologie – Hygiène Hospitalière
PETIT Barbara	Anatomie et Cytologie Pathologiques
PICARD Nicolas	Pharmacologie Fondamentale
QUELVEN-BERTIN Isabelle	Biophysique et Médecine Nucléaire
TERRO Faraj	Biologie Cellulaire
VERGNE-SALLE Pascale	Thérapeutique
VINCENT François	Physiologie

#### PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

CAIRE François	Physiologie
----------------	-------------

#### P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie	Anglais
----------------	---------

#### PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

BUCHON Daniel	Médecine générale
BUISSON Jean-Gabriel	Médecine générale

#### MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

DUMOITIER Nathalie	Médecine Générale
PREVOST Martine	Médecine Générale

## REMERCIEMENTS

À **Madame le Professeur Catherine YARDIN**, Professeur des Universités de cytologie et d'histologie, Praticien Hospitalier, Chef de service, de nous faire l'honneur de présider ce jury. Je tiens à lui exprimer tout ma reconnaissance pour son accueil au sein du service de cytogénétique, pour son enseignement délivré avec bienveillance, ainsi que pour son écoute, sa disponibilité et sa générosité.

À **Monsieur le Professeur Pierre-Marie Preux**, Professeur des Universités de Santé Publique, Praticien Hospitalier, d'avoir accepté de juger notre travail et de nous faire l'honneur de participer au jury de cette thèse. Je tiens à lui témoigner ma sincère gratitude pour le sérieux et l'importance de sa collaboration qui ont largement contribué à la réalisation de notre travail.

À **Monsieur le Professeur Aubard**, Professeur des Universités de Gynécologie-Obstétrique, Chirurgien des Hôpitaux, Chef de service, d'avoir accepté de juger notre travail et de nous faire l'honneur de participer au jury de cette thèse.

À **Monsieur le Professeur Beneytout**, Professeur des Universités de Biochimie et Biologie moléculaire, d'avoir accepté de juger notre travail et de nous faire l'honneur de participer au jury de cette thèse.

À **Monsieur le Docteur Jean-Christophe Pech**, Praticien Hospitalier, Médecin biologiste, de nous faire l'honneur de participer au jury de cette thèse. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour son encadrement au sein du laboratoire, ses conseils et sa gentillesse.

À **Monsieur le Docteur Pascal Piver**, Praticien Hospitalier, Chirurgien des Hôpitaux, de nous faire l'honneur de participer au jury de cette thèse. Je tiens à le remercier pour son accueil au sein du centre d'assistance à la procréation du centre hospitalier de Limoges.

À **Madame le Docteur Sophie Paulhac**, Praticien Hospitalier, Médecin biologiste, pour son encadrement attentif au cours de ce travail. Sa rigueur et sa disponibilité m'ont été d'une aide précieuse. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance pour m'avoir initiée sur le plan pratique et théorique à la biologie de la reproduction, et pour la confiance qu'elle m'a accordée en travaillant dans son service.

**Je tiens par ailleurs à remercier et exprimer toute ma reconnaissance à ceux qui ont contribué à ma formation et à ceux qui m'ont accompagnée avec bienveillance au cours de ces années :**

À tous les membres des laboratoires d'hématologie, de biochimie, de bactériologie et 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.

À l'ensemble de l'équipe du centre d'AMP du CHU de Limoges, en particulier Geneviève et Sylvie à qui je témoigne toute mon amitié. Je remercie en toute sincérité et amitié Marie-Claire et Malvina avec qui j'ai beaucoup apprécié de travailler : je les remercie de m'avoir autant appris en un an, avec rigueur et pédagogie, et d'avoir su me conseiller et me soutenir.

À l'ensemble de l'équipe du laboratoire de cytogénétique pour son accueil et sa gentillesse. Je remercie Françoise de m'avoir initiée à la cytogénétique et Sylvie pour son encadrement, son aide en informatique et ses conseils avisés.

À Renaud de m'avoir aidé pour la bibliographie.

**Pour Papa,**

Qui m'a encouragée tout au long mes études mais qui n'a malheureusement pas pu en connaître l'aboutissement. Merci pour ton amour et pour les valeurs que tu m'as transmises.

**À Maman,**

qui m'a toujours accompagnée durant mes longues études de médecine, avec dynamisme et optimisme. Merci pour tes encouragements et ton amour.

**À mon frère Xavier,**

**À mes sœurs Stéphanie et Françoise,**

Merci pour votre amour et notre complicité.

**À Mehdi,**

Merci pour tout ton immense amour. Au bonheur d'être ensemble et à notre vie future.

**À Denise, Ghislaine, Lahcen, Alexis, Nadia, Martin et Adrien,**

Merci de m'avoir aussi rapidement adoptée.

**À Alban, Lola, Gaspard et Marc,**

Merci de venir agrandir la famille pour notre plus grand bonheur.

**À Laure, ma meilleure amie depuis mon premier jour à Limoges,**

Ma sœur jumelle raconte-t-on...Merci pour notre complicité et pour ces inoubliables années d'internat.

**À Aurélie,**

Merci de l'amitié grandissante que l'on partage et de l'honneur que tu me fais d'être témoin à ton mariage. Merci à **ta famille et à David** pour toute la sympathie qu'ils me témoignent.

À tous mes inoubliables amis de Limoges, **Hélène, Greg, Olivier, Axel et Marie-Laurence,**

À mes complices d'Hippocrate, **Hervé, Serge et Olivier,**

À mes amis lyonnais plus lointain, **Céline, Adrien, Jérémie, Thibault, Lucie, Cyril, Rebecca et Bertrand.**

# SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	7
LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
LEXIQUE STATISTIQUE.....	11
INTRODUCTION.....	13
<b>PARTIE 1 : RAPPELS BIOLOGIQUES ET CLINIQUES.....</b>	<b>15</b>
<b>CHAPITRE 1. LA FECONDATION NATURELLE.....</b>	<b>16</b>
1. LA GAMETOGENESE.....	16
2. LA FECONDATION.....	26
3. LE DEVELOPPEMENT PREIMPLANTATOIRE.....	29
4. L'IMPLANTATION.....	32
<b>CHAPITRE 2. L'INFERTILITE DU COUPLE.....</b>	<b>34</b>
1. QUELQUES DEFINITIONS.....	34
2. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES.....	36
<b>CHAPITRE 3. L'EXAMEN DU COUPLE INFERTILE.....</b>	<b>41</b>
1. LE BILAN FEMININ D'INFERTILITE.....	41
2. LE BILAN MASCULIN D'INFERTILITE.....	46
<b>PARTIE 2 : L'ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION.....</b>	<b>54</b>
<b>CHAPITRE 4. LA PRATIQUE DE L'AMP.....</b>	<b>55</b>
1. LES TECHNIQUES DE PROCREATION MEDICALEMENT ASSISTEE : INDICATIONS ET DEROULEMENT.....	55
2. L'ORGANISATION DE L'AMP EN FRANCE.....	61
3. ÉPIDEMIOLOGIE : BILAN DE L'AGENCE DE BIOMEDECINE EN 2006.....	63
<b>CHAPITRE 5. ASPECTS CLINIQUES ET TECHNIQUES DE L'AMP.....</b>	<b>67</b>
1. LA PRISE EN CHARGE DES COUPLES ET LE DEROULEMENT D'UNE TENTATIVE.....	67
2. LA STIMULATION OVARIENNE ET LE DECLENCHEMENT DE L'OVULATION.....	69
3. LA PONCTION FOLLICULAIRE ET LE RECUEIL DES OVOCYTES.....	75
4. LE RECUEIL ET LE TRAITEMENT DES SPERMATOZOÏDES.....	76
5. LA MISE EN FECONDATION EN FIV CLASSIQUE ET EN ICSI.....	77
6. LA CULTURE <i>IN VITRO</i> DES EMBRYONS ET L'OBSERVATION DES EMBRYONS.....	80
7. LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE.....	86
8. LA CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS SURNUMERAIRES.....	88
<b>PARTIE 3 : ETUDE STATISTIQUE.....</b>	<b>89</b>
<b>CHAPITRE 6. L'ANALYSE DESCRIPTIVE.....</b>	<b>90</b>
1. INTRODUCTION.....	90

2. MATÉRIELS ET MÉTHODE.....	90
3. RÉSULTATS.....	100
4. DISCUSSION.....	111
<b>CHAPITRE 7. RECHERCHE DE CRITÈRES POUR LE SCORE EMBRYONNAIRE .....</b>	<b>130</b>
1. INTRODUCTION-BIBLIOGRAPHIE.....	130
2. MATÉRIELS ET MÉTHODE.....	135
3. RÉSULTATS.....	138
4. DISCUSSION.....	139
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>142</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>143</b>
<b>SITES INTERNET.....</b>	<b>153</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>154</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>159</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ABM</b>	Agence de Biomédecine
<b>ABCD</b>	Agénésie Bilatérale Congénitale des Déférents
<b>ACAS</b>	Anticorps anti-spermatozoïdes
<b>AMP</b>	Assistance Médicale à la Procréation
<b>AMH</b>	Hormone anti-mullérienne
<b>AZF</b>	<i>Azoospermia factor</i>
<b>BLEFCO</b>	Fédération des Biologistes pour l'Etude de la Fécondation <i>in vitro</i> et de la conservation de l'œuf
<b>BMN</b>	Blastomères multinucléés
<b>CECOS</b>	Centre d'Etude et de la Conservation des Oeufs et du Sperme
<b>CFTR</b>	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de carbone
<b>DES</b>	Distilbène® ou diéthylstilboestrol
<b>DNC</b>	Délai nécessaire à concevoir
<b>E2</b>	17β Estradiol
<b>FCS</b>	Fausse couche spontanée
<b>FIV</b>	Fécondation <i>in vitro</i>
<b>FIV-D</b>	Fécondation <i>in vitro</i> avec sperme de donneur
<b>FIVETE</b>	Fécondation <i>in vitro</i> et transfert d'embryon
<b>FIVNAT</b>	Association FIVNAT
<b>FISH</b>	Hybridation fluorescente <i>in situ</i>
<b>FSH</b>	<i>Follicule Stimulating Hormone</i> ou Hormone Folliculo-Stimulante
<b>GEFF</b>	Groupe d'étude de la FIV en France
<b>GEU</b>	Grossesse extra-utérine
<b>GES</b>	<i>Graduated embryo scoring</i>
<b>GnRH</b>	<i>Gonadotrophin Releasing Hormone</i>
<b>HMG</b>	<i>Human menauposal gonadotrophin</i>
<b>HCG ou β-HCG</b>	<i>Hormone chorionic gonadotrophin</i>
<b>ICSI</b>	<i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i>
<b>IAD</b>	Insémination avec sperme de donneur
<b>IMC</b>	Indice de masse corporelle
<b>IMC</b>	<i>Integrated morphology cleavage</i>
<b>IMG</b>	Interruption médicale de grossesse

<b>IUI</b>	Insémination intra-utérine
<b>INSEE</b>	Institut national de la statistique et des études économiques
<b>INSERM</b>	Institut national de la santé et de la recherche médicale
<b>LH</b>	<i>Luteinizing hormone</i> ou Hormone lutéinisante
<b>LHRH</b>	<i>Luteinizing hormone releasing hormone</i>
<b>mL</b>	Millilitre
<b>mm</b>	Millimètre
<b>NPB</b>	<i>Nucleolar Precursor Body</i> ou précurseur des nucléoles
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PMA</b>	Procréation Médicalement Assistée
<b>PN</b>	<i>Pronucleus</i> ou <i>Pronuclei</i>
<b>pg</b>	Picogramme
<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidone
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>OR</b>	Odds Ratio
<b>SA</b>	Semaines d'Aménorrhée
<b>SET</b>	<i>Single Embryo Transfer</i>
<b>SOPK</b>	Syndrome des ovaires polykystiques
<b>SUZI</b>	<i>Subzonal insémination</i>
<b>TEC</b>	Transfert d'embryons congelés
<b>TMS</b>	Test de migration survie
<b>UI</b>	Unité Internationale
<b>µg</b>	Microgramme
<b>µm</b>	Micromètre

## LEXIQUE STATISTIQUE

**Test statistique** : il s'agit d'un calcul fait sous hypothèse nulle ( $H_0$ ) de l'absence de différence entre les groupes comparés et dont le but est de rejeter cette absence. Si le test dépasse un certain seuil (donné par des tables), l'hypothèse nulle est rejetée, avec un risque de se tromper « p », ce qui aboutit à conclure à une différence significative. Dans le cas contraire, on ne peut pas conclure. Un test non significatif peut en effet correspondre soit à l'absence réelle de différence, soit à un manque de puissance (généralement lié à un trop petit nombre pour le problème posé).

**Hypothèse nulle** : c'est l'hypothèse de base testée par la méthode statistique. Il n'y a pas de différence réelle entre les groupes comparés, car ils viennent en fait de la même population et seul le hasard est responsable des différences retrouvées (fluctuations d'échantillonnage).

**Différence significative** : la probabilité que la différence mise en évidence soit liée au simple hasard est très faible (inférieure à 5%). L'absence de différence (ou hypothèse nulle) est rejetée.

**p** : c'est la valeur de la probabilité de se tromper en rejetant l'hypothèse nulle ce qui correspond au risque alpha ( $p < 0,0500$  : moins de 5 chances sur 100 de se tromper ;  $p < 0,001$  : moins de 1 chance sur 1000 de se tromper).

**Risque alpha** : c'est le risque de première espèce, c'est à dire le risque de se tromper en concluant à une différence alors qu'il n'y en a pas, c'est à dire que l'hypothèse nulle est vraie.

**Coefficient de corrélation ou coefficient de Pearson noté r** : son signe  $\pm$  donne le sens de la relation. Plus la valeur de r se rapproche de  $\pm 1$ , plus la relation linéaire est forte, et plus la valeur de r est voisine de 0, plus la relation linéaire est faible.

**Régression logistique** : c'est un test qui analyse la probabilité qu'une variable soit liée à la survenue d'un événement généralement en tout ou rien (comme la survenue d'une grossesse).

**Odds Ratio (OR)** : c'est en français le « rapport de cote ». Il estime le risque relatif.

**Intervalle de confiance à 95% (IC à 95%) :** c'est l'intervalle dans lequel doit se situer l'odds ratio qui a été calculé sur l'échantillon analysé, avec 95% de chance de ne pas se tromper. Lorsque l'intervalle de confiance comprend 1, aucun risque ne peut être démontré (absence de relation ou manque de puissance). Lorsque les deux bornes sont supérieures à 1, le facteur est significatif (positif). Lorsque les deux bornes sont inférieures à 1, le facteur est significatif (négatif).

**Coefficient de détermination ou  $R^2$  :** il est utilisé en régression multiple, il varie entre 0 et 1 et s'exprime souvent en pourcentage. Pour effectuer des prévisions, la valeur du coefficient de détermination doit être élevée, plus la valeur de  $R^2$  est élevée, plus celle de la variation inexpliquée est petite.

# INTRODUCTION

L'assistance médicale à la procréation (AMP) anciennement appelée Procréation Médicalement Assistée (PMA), est l'ensemble des moyens et des techniques mis en œuvre pour pallier à l'hypofertilité voire à la stérilité d'un ou des deux membres du couple.

Historiquement, c'est en 1978 en Angleterre qu'est née Louise Brown, le « premier bébé-éprouvette » après une fécondation in vitro (FIV). Quatre ans plus tard naissait en France Amandine et en 1982 avait lieu la première naissance suite à un transfert d'embryon congelé. Enfin en 1992, une technique révolutionnaire est mise au point pour le traitement des infertilités masculines : la FIV avec microinjection du spermatozoïde ou ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection).

En 1994 est votée en France la loi de bioéthique, révisée en juillet 2004 (art.L.2141) qui encadre la pratique d'AMP. Dans notre pays, l'AMP est une technique fréquemment utilisée : Depuis 1981, près de 130 000 enfants sont nés à la suite d'une AMP. En 2006, 119 000 tentatives ont été réalisées comprenant les techniques d'inséminations, de FIV « classique » et de FIV avec ICSI, et transfert d'embryons congelés ; 14 055 enfants sont nés après FIV et ICSI et 5987 enfants nés après insémination artificielle. Au total, 20 042 enfants sont nés vivants après AMP, soit 2,4% des naissances.

L'AMP représente 120 millions d'euros par an. Le traitement de la stérilité est pris en charge à 100% par la Sécurité sociale (dans la limite de 4 tentatives). La demande est importante car un couple sur sept consulte en France pour infertilité (soit 60 000 nouveaux couples par an).

Concernant le laboratoire d'assistance médicale à la procréation de Limoges, voici quelques rappels historiques : le laboratoire actuel a été ouvert à Limoges en avril 1997 au Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren. La technique de Fécondation in vitro (FIV) est pratiquée au laboratoire depuis 1997 alors que la micro-injection de spermatozoïdes (ICSI) est plus récente (décembre 2002). Le centre d'AMP a été transféré dans le nouvel hôpital de la mère et de l'enfant depuis janvier 2007. Au cours de ces années de pratique d'AMP, un certain nombre de données biologiques et cliniques a été enregistré lors de chaque tentative. C'est l'analyse rétrospective de ces données qui fait l'objet de cette thèse.

Dans un premier temps, sont présentés des rappels de physiologies, les causes d'infertilités, et les examens diagnostiques de l'infertilité. Secondairement, la pratique de l'AMP en France

est décrite ainsi que les aspects cliniques et biologiques de la fécondation in vitro. La troisième partie correspond à l'analyse statistique, qui comprend deux études rétrospectives : la première a permis la description de la pratique de l'AMP (en FIV classique et avec micro-injection) de début 2003 à fin 2006 à Limoges et la mise en évidence de facteurs prédictifs des taux de fécondation, des taux de grossesses et d'accouchements. La deuxième analyse a étudié certains critères relatifs à la qualité embryonnaire afin d'essayer de créer un score embryonnaire pour choisir le ou les embryons à transférer avec les meilleures chances d'implantation.

## **PARTIE 1 : Rappels biologiques et cliniques**

# CHAPITRE 1. LA FECONDATION NATURELLE

Les rappels de physiologie de la reproduction chez l'homme et la femme permettent de mieux comprendre les causes et les traitements de l'infertilité.

## 1. La gamétogenèse

La gamétogenèse est le processus de différenciation cellulaire qui, à partir de cellules souches, aboutit à la production de gamètes haploïdes. Il s'agit de la spermatogenèse chez l'homme pour la formation des spermatozoïdes et de l'ovogenèse chez la femme pour la formation des ovocytes.

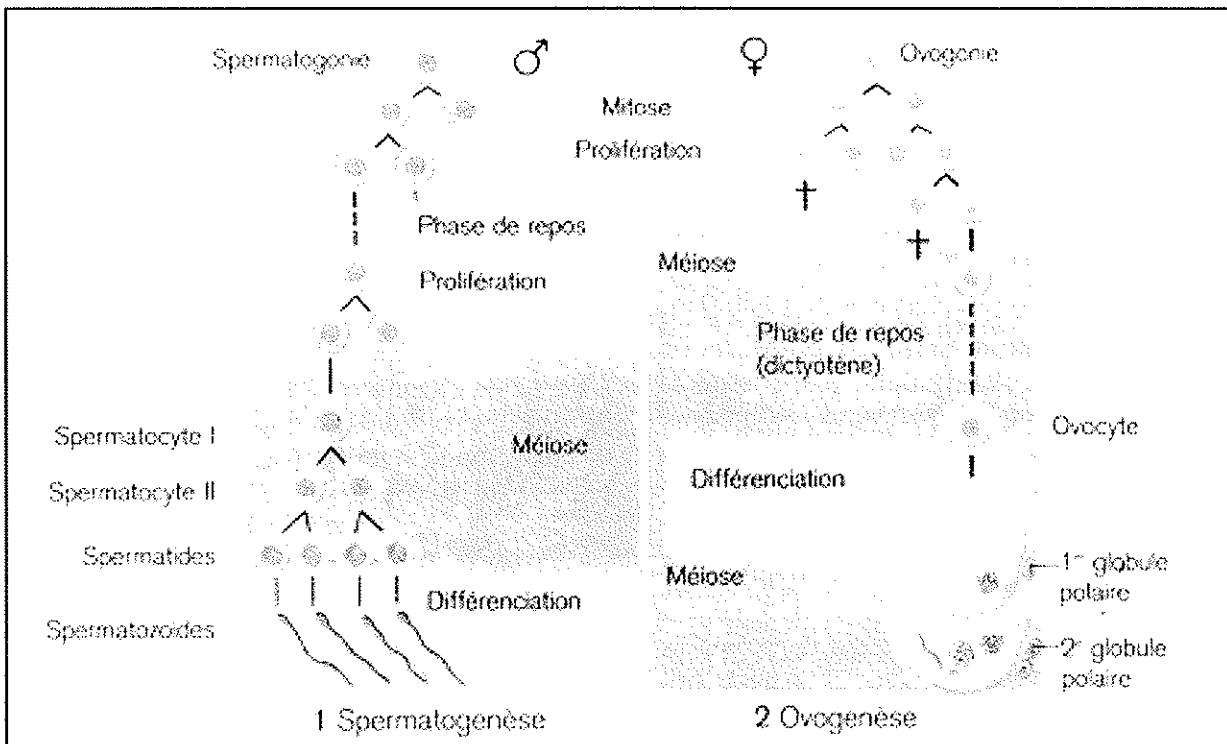


Figure 1-1. Le développement des gamètes mâles et femelles

D'après l'Atlas de poche d'embryologie édition Flammarion, Ulrich Drews, 1994



## 1-1. La spermatogénèse

### 1-1-A. Les différents stades de la spermatogénèse

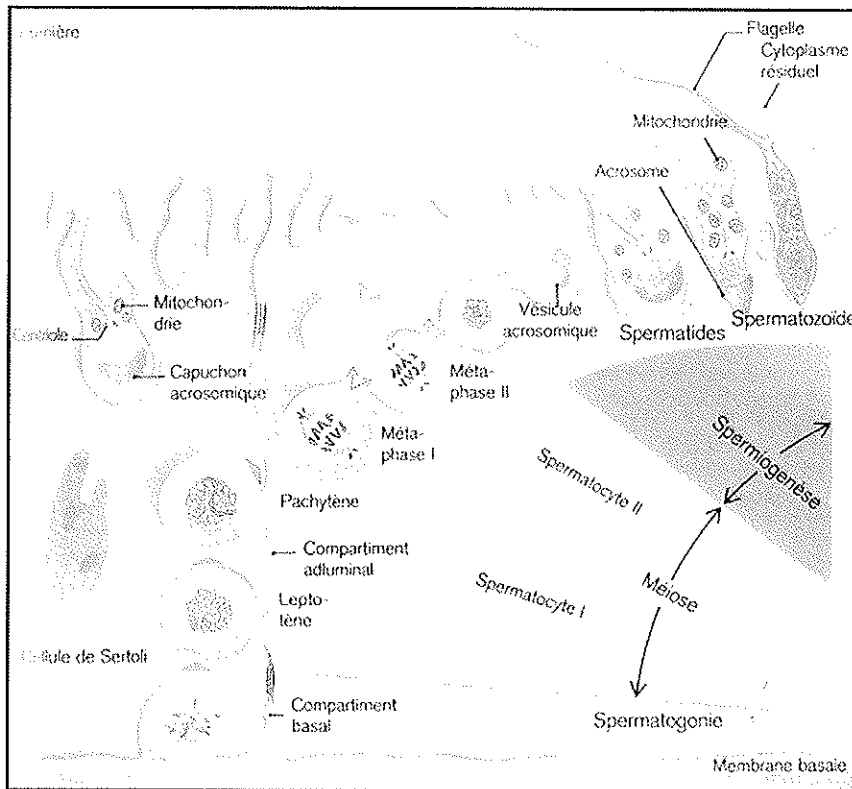


Figure 1-2. La spermatogénèse

D'après l'Atlas de poche d'embryologie édition Flammarion, Ulrich Drews, 1994

Débutant à la puberté, la spermatogénèse est le processus de différenciation cellulaire qui, à partir des cellules souches, aboutit à la production de spermatozoïdes haploïdes. La spermatogénèse se déroule au sein du testicule dans l'épithélium des tubes séminifères en association avec les cellules de Sertoli. Trois familles de cellules germinales disposées en couches superposées entre la membrane basale et la lumière du tube séminifère sont impliquées dans la spermatogénèse : Les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides. À chaque type cellulaire correspond une phase du processus spermatogénétique (figure 1-2).

Ainsi, dans la première phase, les spermatogonies se divisent par mitoses, se renouvellent pour maintenir un pool de cellules souches et simultanément donnent naissance à des gonies différenciées qui vont donner des spermatocytes (figure 1-3). Lors de la deuxième phase, les spermatocytes se divisent au cours de la méiose. Après deux divisions cellulaires successives

avec réduction de moitié du nombre des chromosomes et ségrégation des chromosomes sexuels, ils donnent naissance aux spermatides. Enfin, au cours d'une troisième phase qui correspond à la spermiogenèse, les spermatides se différencient progressivement en spermatozoïdes.

Le testicule assure également une fonction endocrine par les cellules de Leydig, avec l'élaboration des hormones androgènes testiculaires, en particulier la testostérone. La production de spermatozoïdes et d'androgènes se déroule dans deux compartiments testiculaires séparés et sous la dépendance d'hormones adénohypophysaires.

Il existe également un cycle de l'épithélium séminal, où l'ensemble des cellules souches de renouvellement d'une région entière de l'épithélium entre en spermatogenèse périodiquement et à intervalles réguliers, tous les 16 jours. Toutes les spermatogonies issues de ces cellules souches sont reliées par des ponts cytoplasmiques et évoluent en groupe car elles effectuent leur spermatogenèse de manière synchrone. Ainsi, au sein de l'épithélium séminal, les différentes générations de cellules germinales disposées en couches superposées, forment un certain nombre d'association cellulaire de composition constante définissant six stades numérotés de I à VI (figure 1-4).

Les spermatozoïdes, une fois sécrétés dans la lumière des tubes séminifères par spermiation, sont transportés passivement dans le rete testis avec le liquide produit par les cellules de Sertoli, puis dans l'épididyme par les canaux efférents. Ils acquièrent dans l'épididyme leur mobilité. Les spermatozoïdes sont mis en réserve dans la queue de l'épididyme et résorbés s'il n'y a pas d'éjaculation. Le transport par l'épididyme dure de 10 à 14 jours.

La durée de la spermatogenèse est constante, de l'ordre de 74 jours chez l'homme. La production journalière de spermatozoïdes qui est de l'ordre de 200 millions en moyenne, diminue avec l'âge.



## 1-1-B. Le spermatozoïde

Le spermatozoïde est une cellule allongée d'environ 60  $\mu\text{m}$  de long. En microscopie optique, on distingue :

- La tête, contenant le noyau coiffé de l'acrosome ;
- Le flagelle, séparé de la tête par le col et comprenant une pièce intermédiaire, une pièce principale et une pièce terminale.

L'étude de la structure du spermatozoïde en microscopie électronique montre un noyau qui occupe la plus grande partie de la tête. L'acrosome forme un sac autour de la partie antérieure du noyau et se poursuit par la cape post-acrosomique.

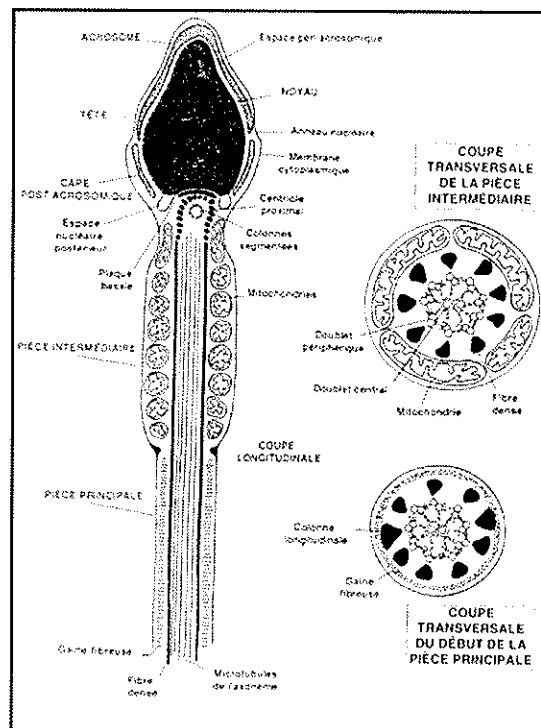


Figure 1-5. L'ultrastructure du spermatozoïde  
D'après biologie de la reproduction humaine éditions Sauramps médical,  
J-C. Czyba et A. Montella, 1993

### **1-1-C. L'éjaculation**

Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes, via le canal déférent, vont se mélanger au plasma séminal (celui-ci est constitué par sécrétion des glandes annexes, des vésicules séminales et de la prostate). Ils sont alors en contact avec les prostasomes (vésicules d'origine plasmatique riche en cholestérol). Ce cholestérol va s'inclure dans la membrane plasmique des spermatozoïdes et diminuer sa fluidité et les mouvements moléculaires dans la membrane.

L'ensemble de ces mécanismes va entraîner un blocage des aptitudes fécondantes du spermatozoïde nécessaire pour préserver le pouvoir fécondant jusqu'au contact de l'ovocyte.

### **1-1-D. Migration des spermatozoïdes dans l'appareil génital de la femme**

Après l'éjaculation, les spermatozoïdes subissent dans les voies génitales féminines une étape de maturation appelée capacitation, au cours de laquelle ils acquièrent la capacité de féconder l'ovocyte.

La capacitation commence dès le passage des spermatozoïdes dans la glaire cervicale. Cela permet d'une part l'élimination de protéines de décapacitation qui recouvraient les spermatozoïdes et d'autre part l'élimination du plasma séminal. Le milieu devient pauvre en cholestérol et la membrane plasmique devient alors plus fluide, voir instable et fusio-gène : des mouvements protéiques membranaires mettent alors à jour des récepteurs. Ainsi les spermatozoïdes capacités :

- Deviennent hypermobiles, facilitant ainsi la pénétration dans la zone pellucide ;
- Ont la possibilité de rompre leur acrosome ;
- Et ont des reconnaissances spécifiques aux protéines de la zone pellucide de l'ovocyte.

Après une première sélection des spermatozoïdes dans le mucus cervical où seuls les plus mobiles progressent, la traversée de l'utérus se fait par des contractions utérines. Dans l'isthme de la trompe, où quelques milliers de spermatozoïdes s'accumulent, des contractions tubaires induisent la libération successive de plusieurs dizaines de spermatozoïdes à la fois,

qui progressent le long des trompes grâce à leur mobilité et aux contractions tubaires qui permettent également, mais en sens inverse, la migration des ovocytes ovulés, du pavillon à l'isthme. Au moment de la rencontre des deux gamètes, au niveau du tiers supérieur de la trompe, quelques centaines de spermatozoïdes sont présents autour de l'ovocyte (figure 1-8).

## 1-2. L'ovogenèse

### 1-2-A. Les différents stades de l'ovogenèse

L'ovogenèse est définie comme l'ensemble des processus formation-croissance-différenciation, qui transforment la cellule germinale initiale ou ovogonie en une cellule apte à être fécondée, l'ovocyte II. Son déroulement se fait de façon discontinue, sur plusieurs années, et il est limité dans le temps du fait de l'épuisement de la réserve ovarienne.

L'ovogenèse débute dans l'ovaire fœtal grâce à la multiplication par mitose des ovogonies de la 15<sup>e</sup> semaine de développement au 7<sup>e</sup> mois de vie. Au terme de leur multiplication, les ovogonies deviennent des ovocytes I (prophase de la première division de méiose) et à ce stade, le noyau porte le nom de vésicule germinale. Chaque ovocyte est entouré d'une couche de cellules folliculeuses pour constituer des follicules primordiaux.

Un stock de follicules primordiaux est alors constitué et il ne cessera de diminuer tout au long de la vie fœtale, de l'enfance et de la vie génitale de la femme, pour atteindre 400 000 à la puberté et 1500 à 25 000 vers 45 ans. En effet, un certain nombre d'ovocytes de follicules primordiaux quittent cette réserve pour démarrer la phase de croissance ovocytaire, étroitement liée à la croissance folliculaire : c'est la folliculogenèse (figure 1-6).

La majorité des gamètes femelles (99.9%) n'est pas ovulée, mais au contraire devient atrophiques par apoptose et ce phénomène s'accélère à partir de 40 ans jusqu'à la ménopause. Au maximum 400 ovocytes seront ovulés pendant la vie reproductive de la femme.

### 1-2-B. La folliculogenèse

C'est un phénomène continu car chaque jour, un certain nombre de follicules primordiaux (de 1 à 30 environ) entre en phase de croissance. Le nombre de follicules qui entrent en croissance diminue avec l'âge, en particulier à partir de 38 ans et devient très faible au moment de la ménopause.

Les aspects morphologiques du développement folliculaire ont permis de classer les follicules et de décrire deux phases : préantrale (50 à 200 µm de diamètre jusqu'au follicule tertiaire) et antrale (200 µm de diamètre : follicule de De Graaf). La folliculogénèse se déroule pendant toute l'enfance et la période pré-pubertaire jusqu'au stade pré-antral; ce n'est qu'après la puberté que des follicules antraux (pré-ovulatoires) se formeront régulièrement.

La croissance folliculaire dite basale commence en début de phase lutéale (cycle n). Elle permet à une cohorte de follicules préantraux d'atteindre le stade antral au cycle suivant (cycle n+1), et de devenir en fin de phase lutéale du cycle suivant (cycle n+2) des follicules susceptibles d'ovuler. Cette croissance basale est stimulée par les gonadotrophines. C'est donc parmi ces follicules, que 85 jours plus tard, un follicule deviendra dominant (dans son développement) puis ovulatoire. La croissance dite terminale débute en fin de cycle précédant le cycle ovulatoire, par le recrutement de follicules susceptibles d'ovuler sous l'influence de la FSH (Hormone Folliculo-Stimulante), puis elle se poursuit en début de phase folliculaire par la sélection du follicule dominant (influence de la FSH et de la LH, l'hormone lutéinisante).

### **1-2-C. Cycle ovarien et ovulation**

Le cycle ovarien est l'intervalle entre deux ovulations successives. Il comporte deux phases :

- **La phase folliculaire** : croissance du follicule ovulatoire jusqu'à l'ovulation entre J12 et J16 (déclenchée par le pic de LH) ;
- **La phase lutéale** : croissance du corps jaune.

C'est au début de la phase folliculaire, entre J1 et J5, que l'un des grands follicules se développe plus rapidement que les autres : c'est la sélection du follicule dominant. Les cellules de la granulosa de ce follicule synthétisent de l'oestrogène. Entre le 12<sup>e</sup> et le 14<sup>e</sup> jour du cycle, le follicule dominant devient préovulatoire (plus de 16 mm de diamètre) avec une sécrétion importante d'oestrogènes. Alors se produit une montée de LH : c'est la décharge ovulante. Pendant la phase lutéale, le follicule rompu évolue en corps jaune, qui sécrète la progestérone.

Suite à l'ovulation, trois éléments sont essentiels à la maturation ovocytaire :

- **La reprise de la méiose bloquée pendant la vie fœtale** : la vésicule germinale disparaît et l'ovocyte expulse son premier globule polaire (fin de la méiose I) et débute la deuxième division de méiose puis se bloque en métaphase II. Le globule polaire réunit un jeu de chromosome dans un résidu cytoplasmique. Parallèlement se produit une maturation cytoplasmique ovocytaire, qui prépare la formation des *pronuclei* (PN).

La qualité de l'ovocyte dépend de cette maturité, qui est essentielle pour une fécondation et un développement embryonnaire normaux.

- La rupture folliculaire et l'expulsion de l'ovocyte et des cellules qui l'entourent (*corona radiata*).
- La libération de l'ovocyte qui s'échappe dans la trompe.

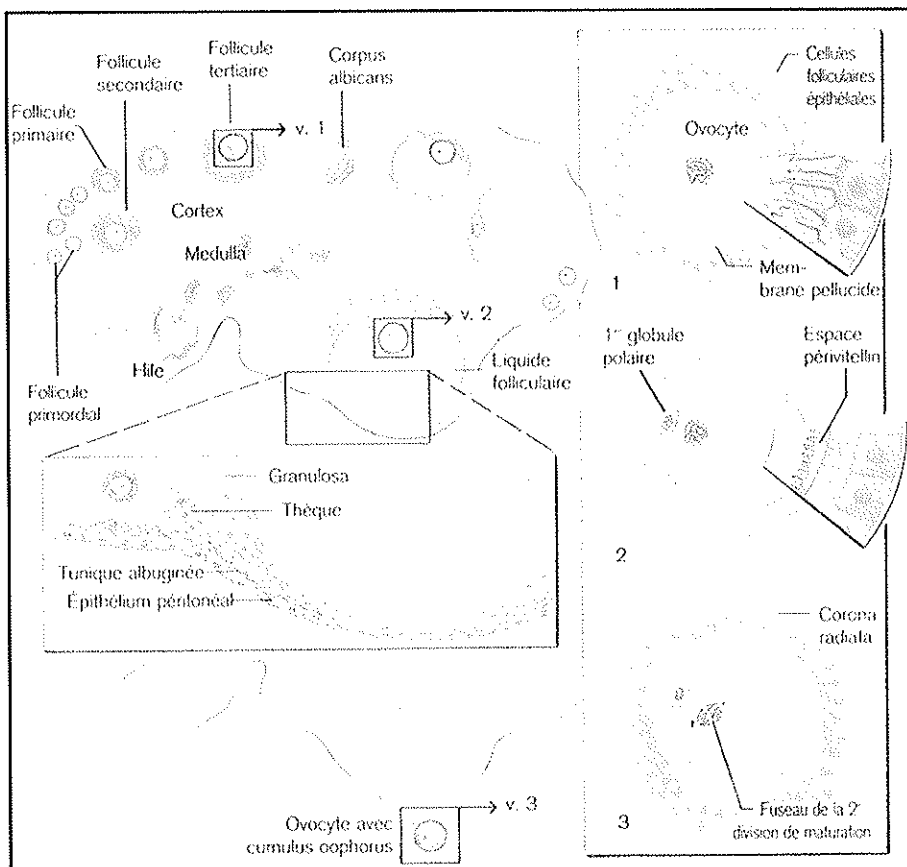


Figure 1-6. L'ovaire avec croissance d'un follicule dominant

D'après l'Atlas de poche d'embryologie édition Flammarion, Ulrich Drews, 1994



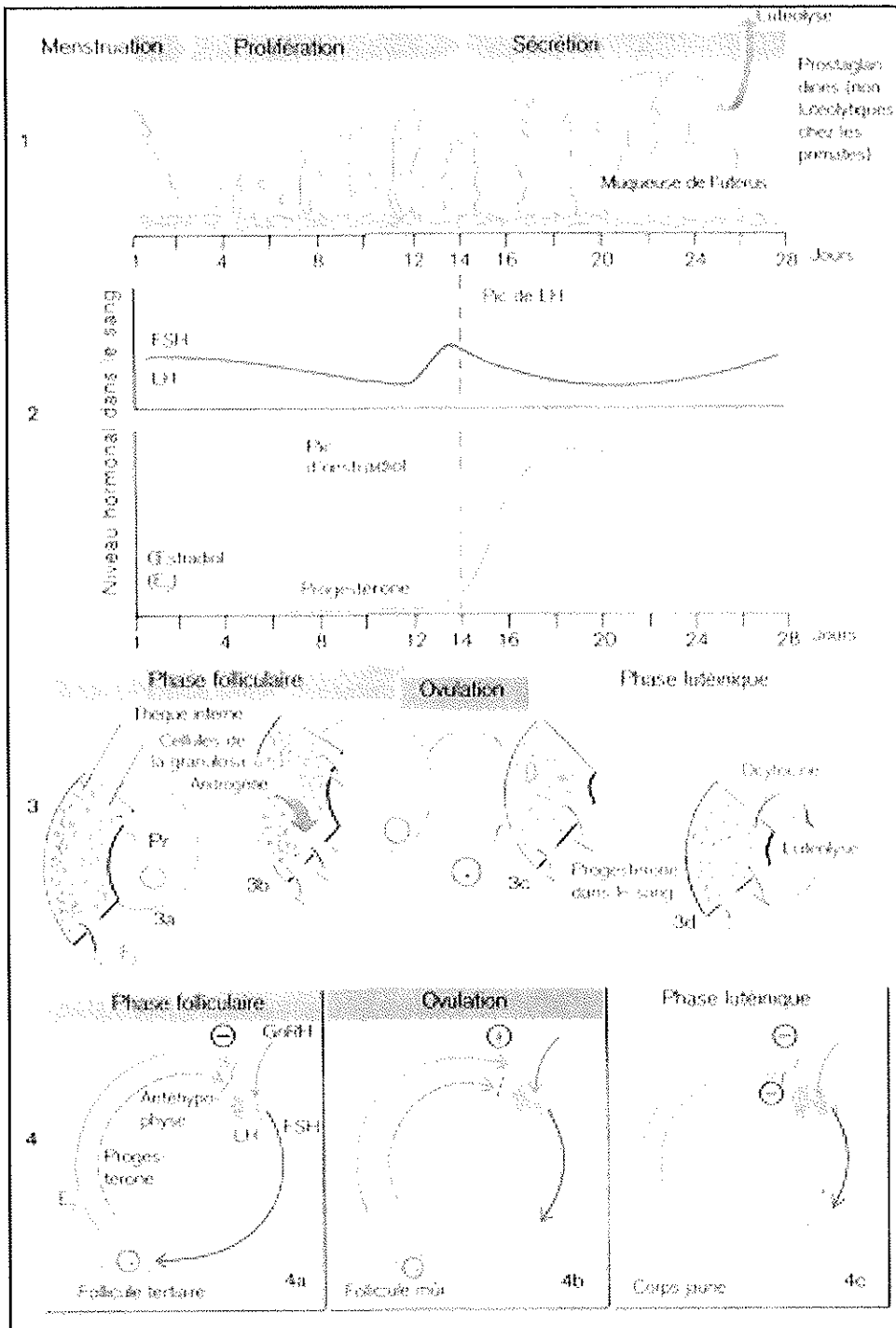


Figure 1-7. Le cycle menstruel

D'après l'Atlas de poche d'embryologie édition Flammarion, Ulrich Drews, 1994

## 2. La fécondation

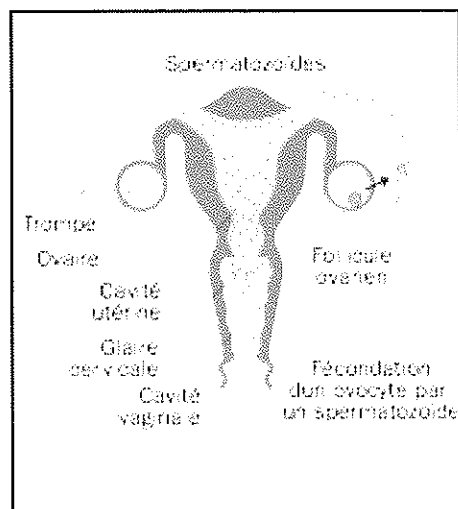


Figure 1-8. La fécondation naturelle

Extrait de la notice d'information de l'Agence de Biomédecine

C'est la fusion de deux cellules haploïdes (le spermatozoïde et l'ovocyte), en une cellule unique, l'œuf fécondé ou zygote. Sa division, par de nombreuses mitoses, aboutira à la formation de l'embryon.

Les deux gamètes se rencontrent dans la trompe. L'ovocyte bloqué en métaphase II est entouré de la zone pellucide et de la corona radiata. Il n'a qu'une survie très courte de 8 à 10 heures pour permettre une fécondation normale. Les spermatozoïdes conservent leur pouvoir fécondant pendant deux à trois jours après l'éjaculation. Capté par le pavillon tubaire, l'ovocyte migre dans l'ampoule où il peut éventuellement rencontrer le spermatozoïde.

Les spermatozoïdes capités et hyperactivés s'accrochent à la zone pellucide. Cette liaison est strictement spécifique. L'adhésion à la zone pellucide entraîne la réaction acrosomique. C'est un phénomène calcium dépendant qui, par exocytose (fusion entre la membrane plasmique et la membrane acrosomique externe), libère les enzymes contenues dans l'acrosome. La hyaluronidase et l'acrosine libérées au moment de la réaction acrosomique facilitent le passage du spermatozoïde à travers la zone pellucide.

Après la réaction acrosomique, la membrane acrosomique interne se retrouve exposée, et directement en contact avec la zone pellucide. Grâce au battement de flagelle hyperactivé, le spermatozoïde traverse cette enveloppe en suivant un trajet oblique.

Il pénètre ensuite dans l'espace périvitellin et entre en contact avec la membrane plasmique de l'ovocyte. Il s'immobilise et les deux gamètes fusionnent. Cette fusion libère du calcium et active l'ovocyte : c'est la réaction corticale. Il y a une exocytose des granules corticaux, et libération d'enzymes hydrolytiques qui vont modifier la zone pellucide et la rendre imperméable à la pénétration d'autres spermatozoïdes et éviter ainsi la polyspermie.

L'ovocyte activé termine sa deuxième division méiotique avec expulsion du deuxième globule polaire et formation d'un *pronucleus* femelle (PN) haploïde à chromatine condensée. Parallèlement à la formation du *pronucleus* femelle, le spermatozoïde est phagocyté. Son enveloppe nucléaire disparaît et la chromatine est décondensée (figure 1-11). Un *pronucleus* mâle (PN) apparaît presque en même temps que le *pronucleus* femelle, entouré d'une nouvelle enveloppe nucléaire et de taille semblable. Les *pronuclei* se trouvent dans la zone corticale de l'ovocyte 12 heures après le début de l'activation et une réplication d'ADN a lieu dans chaque *pronucleus*. Ensuite, ils migrent l'un vers l'autre au centre de l'œuf, guidés par des microfilaments du cytoplasme (stade à 2 PN). À ce stade, l'ovocyte fécondé est nommé zygote. Les deux noyaux se placent l'un au contact de l'autre. Chaque noyau entre en prophase : les chromosomes apparaissent et le fuseau de division s'organise. Après destruction des enveloppes nucléaires, les chromosomes se placent sur le fuseau et forment la plaque équatoriale. Cette présence simultanée sur le fuseau des chromosomes maternels et paternels marque la fin de la fécondation (stade à 0 PN) et le début du développement embryonnaire.

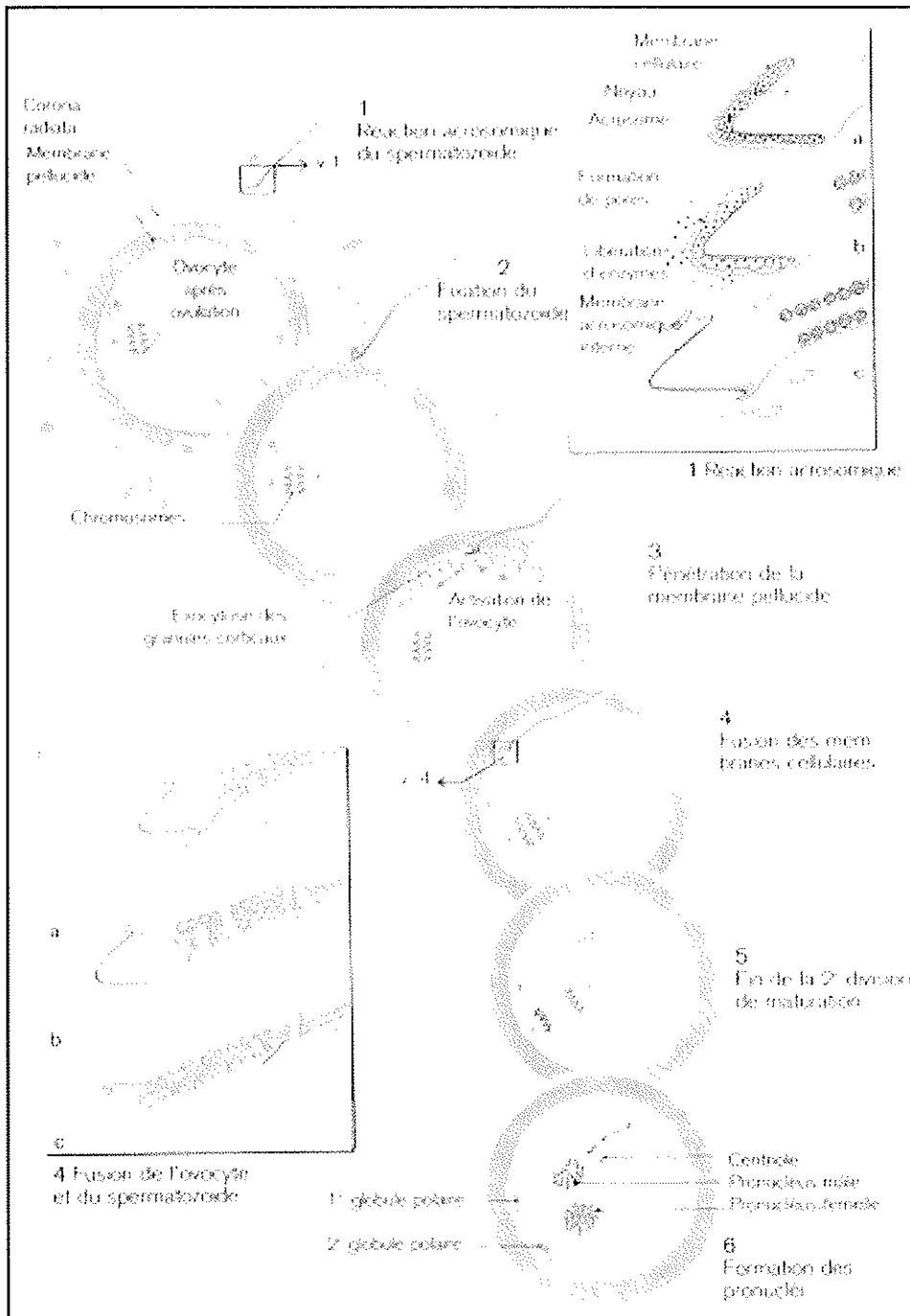


Figure 1-9. La fécondation

D'après l'Atlas de poche d'embryologie édition Flammarion, Ulrich Drews, 1994

### 3. Le développement préimplantatoire

#### 3-1. La segmentation

Après fusion des *pronuclei*, l'œuf se divise par mitoses successives en cellules appelées blastomères (segmentation) dont la taille diminue progressivement au cours du développement. Les observations *in vitro* ont montré que la première division a lieu entre la 25<sup>e</sup> et la 26<sup>e</sup> heure chez l'homme. Les premières segmentations de l'embryon ont lieu en même temps que se fait la migration vers l'utérus. Il s'arrête pendant 48 heures à jonction isthme-ampoule de la trompe, puis il parcourt l'isthme en une dizaine d'heures et arrive dans la cavité utérine (figure 1-10).

Cette migration se fait sous contrôle de la progestérone qui induit des contractions tubaires.

Au quatrième jour après la fécondation, l'embryon comporte une trentaine de blastomères identiques, la morula. Les synthèses protéiques proviennent d'abord de la traduction de l'information accumulée dans l'ovocyte préovulatoire. C'est au stade de huit cellules que commence la transcription du génome embryonnaire, étape clef où se joue l'avenir de l'embryon.

#### 3-2. La compaction

Vers le quatrième ou le cinquième jour, il y a compaction des blastomères avec des contacts étroits entre eux et chaque cellule se polarise avec la migration du noyau. C'est la première manifestation d'une activité génétique différentielle. Le blastocyste formé à J5 ou J6 est défini par la présence d'une cavité centrale, le blastocèle complètement entouré par une assise cellulaire appelée trophoctoderme ou trophoblaste. À l'intérieur du blastocyste, à un pôle, une vingtaine de blastomères internes forment le bouton embryonnaire ou masse cellulaire interne. Ces cellules formeront ensuite l'endoderme et l'ectoderme primitifs de l'embryon.

Les sécrétions utérines sous l'influence de la progestérone jouent un rôle nutritif dans le développement embryonnaire jusqu'au stade de blastocyste.

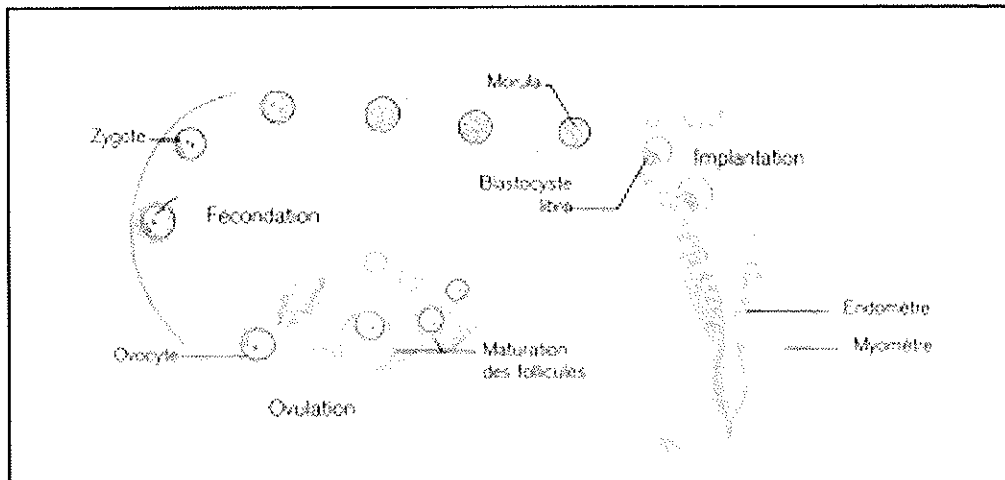


Figure 1-10. De l'ovulation à l'implantation  
 D'après l'Atlas de poche d'embryologie édition Flammarion, Ulrich Drews, 1994

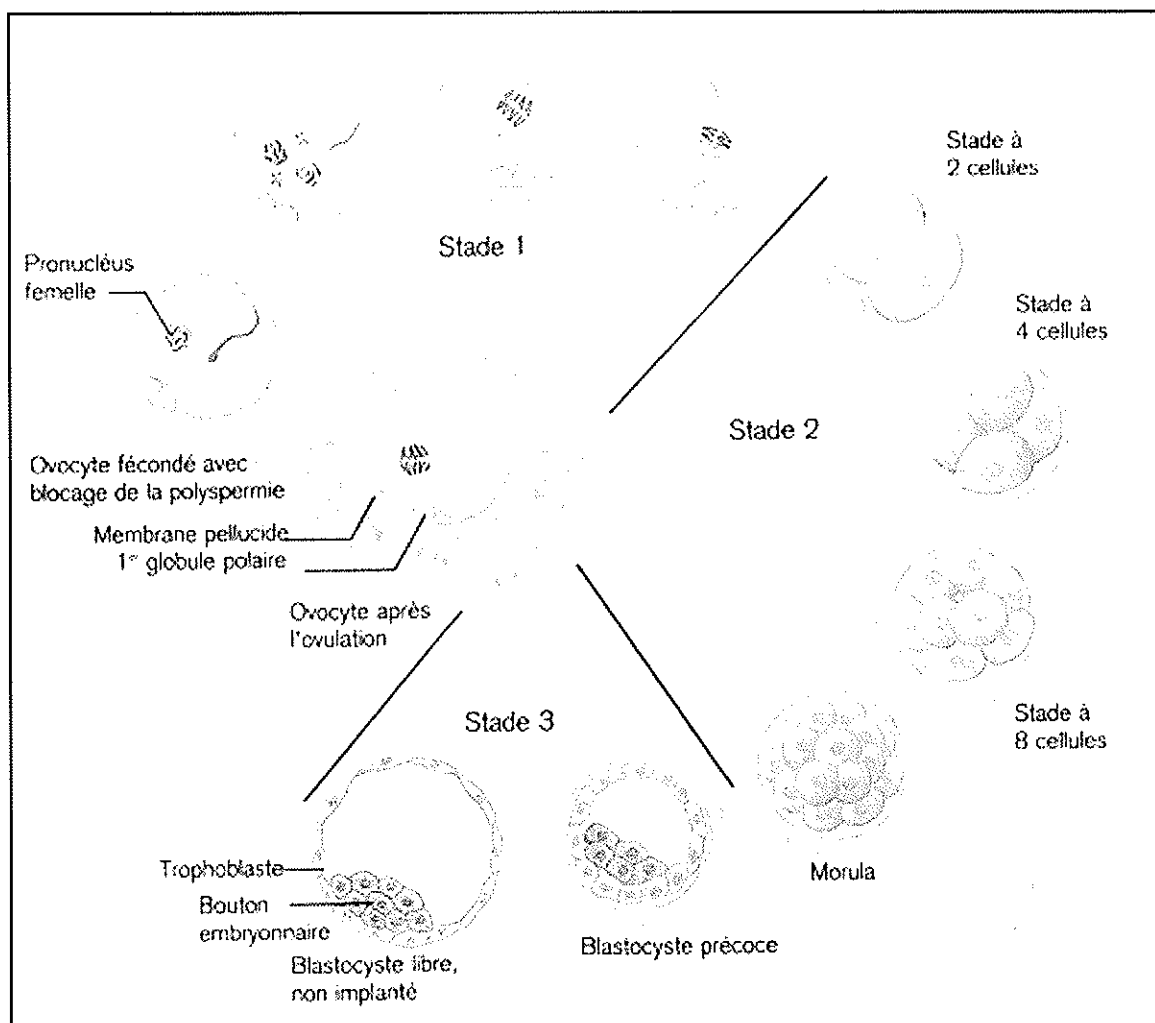
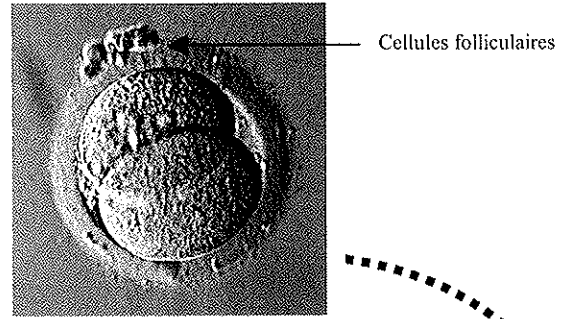
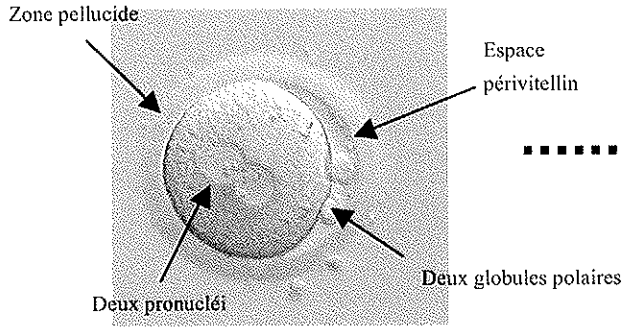


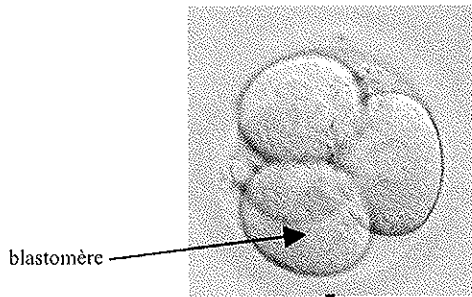
Figure 1-11. Le développement de l'ovocyte en blastocyste  
 D'après l'Atlas de poche d'embryologie édition Flammarion, Ulrich Drews, 1994

À J1, stade de zygote

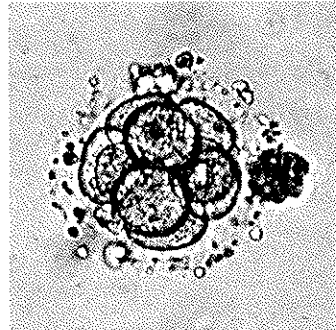
À la 26<sup>e</sup> heure, embryon à deux blastomères



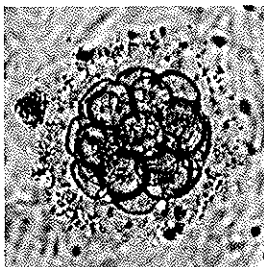
À J2, embryon à quatre cellules



À J3, embryon à huit cellules



À J4, stade de morula



À J5 ou J6, stade de blastocyste

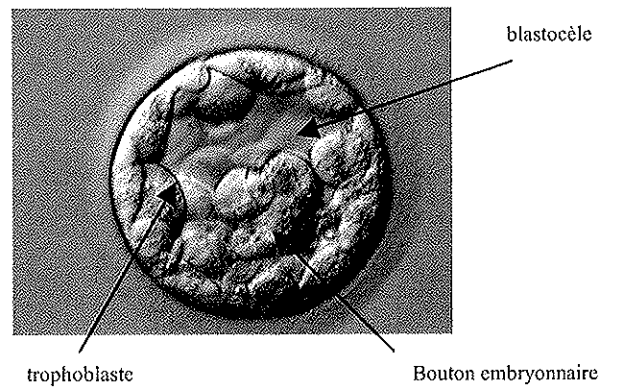


Figure 1-12. Le développement du zygote au blastocyste  
Photographies d'après l'AMP en pratique  
édition Masson J. Lansac et F. Guérif, 2005

## 4. L'implantation

L'implantation résulte de l'action du trophoblaste différencié sur un endomètre réceptif. Cette synchronisation est nécessaire et la fenêtre d'implantation s'étale du 20<sup>e</sup> au 23<sup>e</sup> jour du cycle.

L'implantation ne peut se produire qu'au stade de blastocyste. Le 6<sup>e</sup> jour après la fécondation, la zone pellucide qui entoure et protège le blastocyste se rompt, fragilisée par des enzymes protéolytiques du trophoblaste. Le blastocyste s'échappe hors de la zone pellucide : c'est l'éclosion du blastocyste. Le trophoblaste situé près du bouton embryonnaire entre en contact avec l'endomètre et prolifère rapidement au point de fixation. Il forme une masse plurinucléée, le syncytiotrophoblaste, qui envahit progressivement l'endomètre. C'est vers le 12<sup>e</sup> jour que l'embryon pénètre dans la paroi utérine : c'est la nidation.

L'invasion de l'œuf se réalise par intrusion du trophoblaste qui s'insère entre les cellules utérines. Cette invasion va se poursuivre sous l'action d'enzymes protéolytiques sécrétées par le syncytiotrophoblaste. Dans ce dernier, quelques lacunes s'ouvrent et sont traversées par une circulation de sang maternel. Autour de l'œuf apparaissent ensuite une modification du stroma endométrial et une réaction immunologique locale.

La modification de l'endomètre appelée réaction déciduale, consiste essentiellement en une transformation des fibroblastes du stroma en une volumineuse cellule sphérique chargée de glycogène.

En cas d'implantation, cette réaction de l'endomètre sera maintenue grâce aux sécrétions du corps jaune devenu gestatif sous l'action de l'hCG (*Hormone chorionic gonadotrophin*) sécrétée par le trophoblaste. Cette hormone apparaît dans le plasma maternel dès le 8<sup>e</sup>-9<sup>e</sup> jour après la fécondation, puis un peu plus tard dans l'urine, et constitue ainsi un diagnostic précoce de la grossesse.

Si aucune implantation ne se produit, la dégénérescence des cellules déciduales péri-artérielles, consécutive à la privation hormonale de la fin du cycle non conceptuel aboutit à l'érosion des vaisseaux endométriaux, la menstruation.



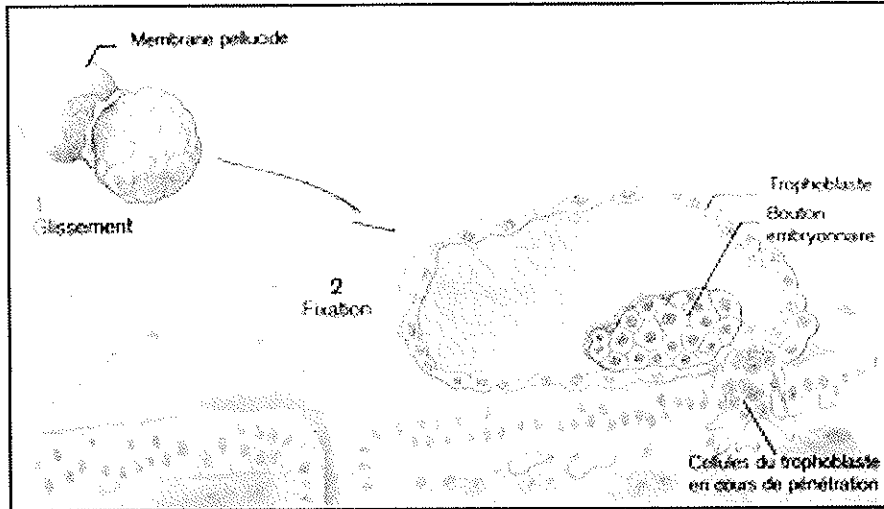


Figure 1-13. La fixation du blastocyste sur la muqueuse  
D'après l'Atlas de poche d'embryologie édition Flammarion, Ulrich Drews, 1994

# CHAPITRE 2. L'INFERTILITE DU COUPLE

## 1. Quelques définitions

### 1-1. Fertilité et infertilité

- La fertilité est l'aptitude à procréer. L'infertilité est l'incapacité à procréer et peut être :
  - Primaire, c'est l'absence de grossesse après un minimum d'un an de rapports sexuels non protégés chez une femme qui n'a jamais eu grossesse.
  - Secondaire, c'est l'absence de grossesse après un minimum d'un an de rapports sexuels non protégés chez une femme qui a déjà eu une grossesse.
- Tous les degrés de fertilité sont possibles. Certains couples sont :
  - Très fertiles : ils pourront procréer très facilement ;
  - Moyennement fertiles : ils pourront procréer facilement ;
  - Peu fertiles (hypofertilité modérée) : ils peuvent procréer difficilement ;
  - Très peu fertiles (hypofertilité sévère) : ils ne peuvent procréer que difficilement ;
  - Infertiles ou stériles : ils ne peuvent pas procréer sans traitement.

### 1-2. Fécondité et infécondité

La fécondité est le fait d'avoir procréé. L'infécondité est le fait de ne pas avoir procréé de façon volontaire ou involontaire.

### 1-3. Fécondabilité

La fécondabilité exprime le degré de fertilité, c'est-à-dire le pourcentage de chance de procréer par cycle; elle varie d'un couple à l'autre (figure 2-2) et se base sur la durée d'infertilité. L'âge de la femme est un facteur important puisque la fécondabilité passe de 25% par cycle à 20 ans, à une fécondabilité presque nulle après 45 ans.

On considère que parmi les couples qui consultent :

- 10% présentent une hypofertilité modérée (durée d'infertilité de 2 ans) ;
- 1% présentent une hypofertilité sévère (durée d'infertilité de 5ans) ;
- 0,1% présentent une infertilité ou stérilité (durée d'infertilité de 10 ans).

## 1-4. Le délai nécessaire à concevoir

Le délai nécessaire à concevoir (DNC) est le temps qui s'écoule entre l'arrêt de toute contraception et l'obtention d'une grossesse. Le DNC dépend du taux de fécondabilité :

$$\text{DNC} = 1 / \text{fécondabilité}$$

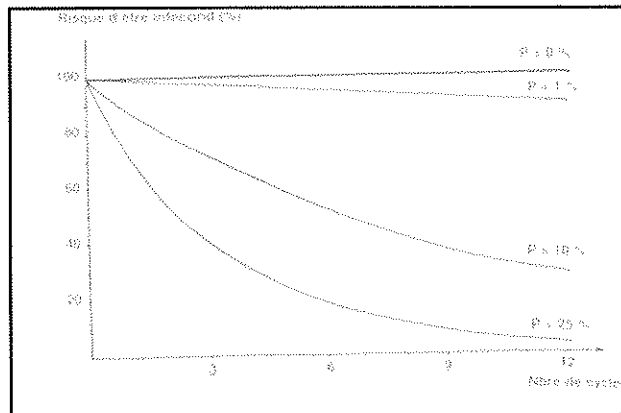


Figure 2-1. Risque de ne pas avoir conçu après n cycles pour les couples d'infertilité à 25%, 10%, 1% et 0%.

D'après Reproduction et développement édition Sauramps médical, C. Humeau, 2005

- Si le taux de fécondabilité est supérieur à 50%, le DNC sera inférieur à 2 cycles (10% des couples).
- Si le taux de fécondabilité est inférieur à 10%, le DNC sera supérieur à 10 cycles (10% des couples).

- Ainsi le taux moyen de fécondabilité de 80% se situe entre ces deux valeurs, avec un taux moyen de fécondabilité de 25%, le DNC étant alors de 4 cycles.

À titre d'exemple, avec un taux de fécondabilité de 1%, le DNC passe à 100 cycles, c'est-à-dire 8 ans. Classiquement, le DNC est considéré comme pathologique pour un délai supérieur à 2 ans, ce qui implique une prise en charge médicale. Cependant, la conduite à tenir est fonction de l'âge de la femme. Notons aussi que la fécondabilité est variable en fonction de la date des rapports ; elle est optimale à l'ovulation.

## 2. Données épidémiologiques

### 2-1. L'importance de l'infertilité

La stérilité n'est pas un problème de couple rare. Selon de récentes études, 10–15% des couples en Europe ont des difficultés à réaliser leur rêve d'être parent (Boivin *et al.*, 2007).

Un couple sur sept consulte en France pour infertilité, soit 60 000 nouveaux couples par an.

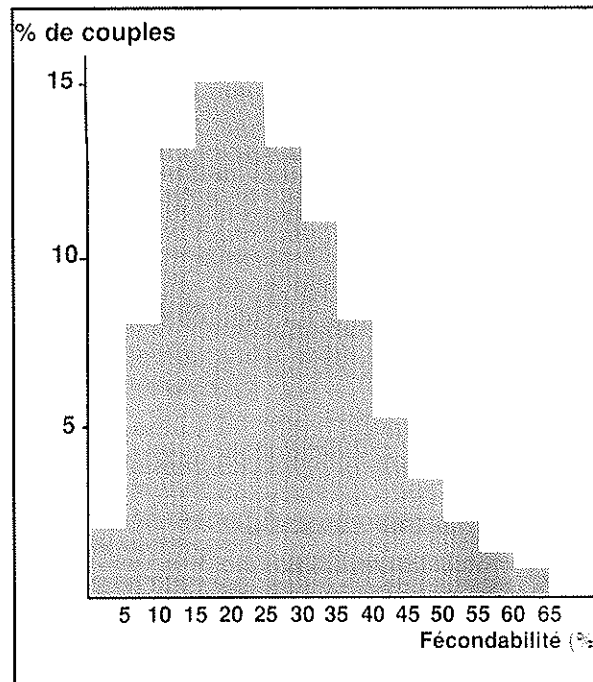


Figure 2-2. Distribution actuelle de la fécondité

D'après Reproduction et développement édition Sauramps médical, C. Humeau, 2005

### 2-2. Les causes d'infertilité

#### 2-2-A. Généralités

Parmi les causes d'infertilité :

- **30%** sont d'origine féminine ;
- **20%** sont d'origine masculine ;
- **Dans 40% des cas**, les deux membres du couple sont hypofertiles ;
- **Dans 10% des cas**, aucune cause n'est retrouvée et l'infertilité sera dite « inexplicée » (Thonneau *et al.*, 1991).

Il faut souligner que la fécondité baisse avec l'âge passant pour la femme de 25% par cycle à l'âge de 20 ans à pratiquement nulle à l'âge de 45 ans (Spira *et al.*, 1986). Il en est de même pour les hommes : s'ils ont plus de 45 ans, ils mettent cinq fois plus longtemps à concevoir qu'à 25 ans (Hassan *et al.*, 2003). Or, on assiste à un recul de l'âge de la première grossesse en France, l'âge moyen à la maternité en 1977 était de 26,5 ans. Depuis, cet âge ne fait qu'augmenter pour atteindre 29,4 ans en 2001. Les raisons principales sont notamment : la poursuite des études, la volonté de réussir professionnellement, d'atteindre un confort matériel suffisant, et les tentatives d'unions infructueuses.

Cela explique une part non négligeable des demandes d'assistance médicale pour infertilités dites « inexplicées », liée en fait à la baisse de la fertilité due à l'âge de l'homme et de la femme (Dunson *et al.*, 2004). Ainsi, au moment de la première consultation, l'âge moyen des femmes est de 30 ans pour les infécondités primaires et de 32 ans pour les infécondités secondaires alors qu'il est pour les hommes respectivement de 32 ans et de 34 ans.

### 2-2-B. Causes d'infertilité chez la femme

D'après l'étude multicentrique menée en 1989 en France par l'INSERM (Institut national de la santé et de la recherche en France) (Thonneau *et al.*, 1991), les causes principales d'infertilité sont répertoriées sur la figure ci-dessous :

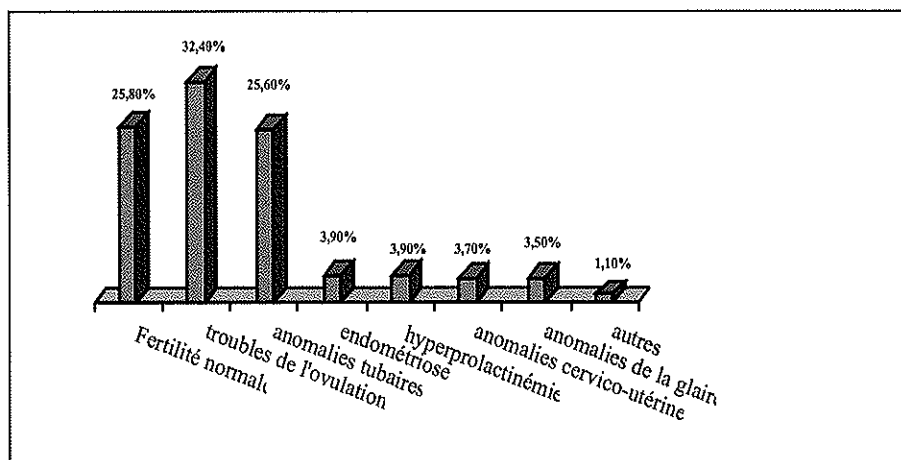


Figure 2-3. Diagnostics médicaux chez 1551 femmes de couples infertiles (Thonneau *et al.*, 1991)

Les étiologies de l'infertilité chez la femme sont répertoriées dans le tableau 2-1. D'après cette étude multicentrique, on peut aussi décrire certains facteurs de risque d'infertilité chez la femme (Thonneau *et al.*, 1992).

- **L'âge maternel**

La fertilité est maximum vers 25 ans, diminue avec l'âge et devient quasiment nulle après 45 ans, avec une proportion anormalement élevée d'anomalies génétiques à partir de 38 ans. En fécondation *in vitro*, la baisse de la production ovocytaire après 35 ans est d'environ 50%. De plus, lorsque la réserve ovarienne est diminuée quel que soit l'âge de la patiente, la fertilité devient très faible : l'élévation du dosage de la FSH en début de cycle et un test de réserve ovarienne défavorable traduisent une mauvaise qualité ovarienne.

- **Les infections génitales**

Les risques d'obstruction tubaire sont particulièrement liés aux infections génitales à *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* (risque d'infertilité multiplié par 32).

- **Le tabac**

Il allonge le délai de conception et diminue la réserve ovarienne.

- **Les antécédents chirurgicaux**

L'appendicectomie et chirurgie pelvienne avec un risque d'infertilité multipliée par 5.

### 2-2-C. Causes d'infertilité chez l'homme

Toujours d'après cette étude multicentrique française (Thonneau *et al.*, 1991), les principales anomalies du sperme en cause dans l'infertilité sont répertoriées sur la figure 2-4.

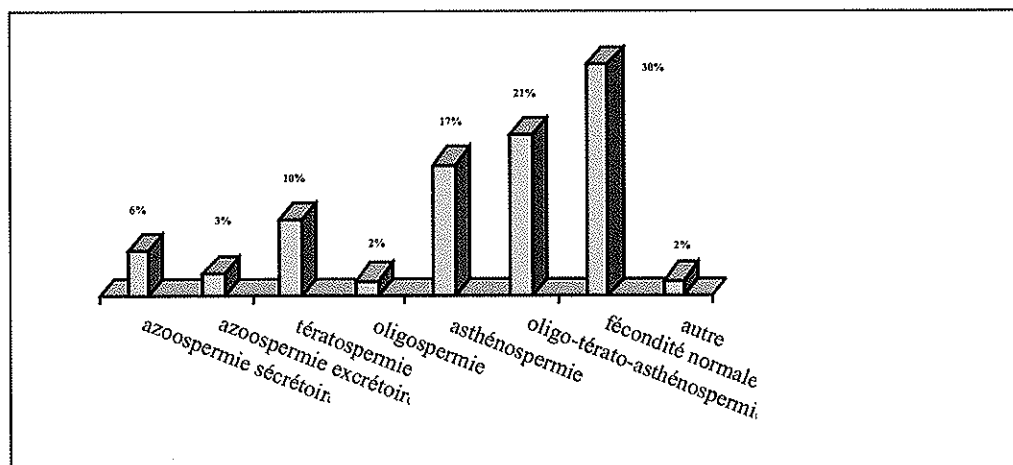


Figure 2-4. Anomalies du spermogramme chez les hommes consultant pour infertilité (Thonneau *et al.*, 1991)

Les étiologies de l'infertilité chez l'homme sont répertoriées dans le tableau 2-2.

On distingue aussi des facteurs de risque d'infertilité chez l'homme (Thonneau *et al.*, 1992) :

- **Des facteurs urologiques**

Les antécédents traumatiques, de torsion testiculaire uni- ou bilatérale, une cryptorchidie opérée ou non constituent un facteur de risque d'azoospermie et le multiplie par 5. La présence d'une varicocèle multiplie le risque d'oligoasthénozoospermie par 4. Les antécédents de IST multiplient le risque d'infertilité par 2.

- **Des facteurs liés au mode de vie**

L'absorption habituelle de toxiques (alcool, tabac, drogues) s'accompagne d'une diminution de la numération spermatique. La spermatogenèse est aussi altérée par l'exposition prolongée à la chaleur et la prise de certains médicaments.

- **L'âge**

Ce facteur intervient mais de façon moins prépondérante que chez la femme : il existe une diminution du nombre de spermatozoïdes produits du fait de l'augmentation du tissu de soutien du testicule (albuginée principalement). Ces altérations spermatiques ne s'observent significativement qu'après 55 ans.

Tableau 2-1. Les principales causes d'hypofertilité chez la femme

Niveau de l'anomalie	Causes
Production des gamètes	<b>Insuffisance Ovarienne primitive</b>
	<b>Insuffisance ovarienne secondaire à une insuffisance gonadotrope</b> (atteinte hypothalamique et/ou hypophysaire)
	<b>Dysovulation</b> : Syndrome des ovaires polykystiques
Transit des gamètes	<b>Au niveau de l'utérus et du vagin</b> , malformations comme dans le syndrome DES (distilbène)
	<b>Au niveau tubaire</b> , séquelles de : - Salpingite (chlamydiae) - Grossesse extra-utérine
Glaires cervicales	<b>Infection de la glaire</b>
	<b>Insuffisance de production</b>
	<b>Présence d'anticorps anti-spermatozoïdes (ACAS)</b>
Nidation	<b>Anomalies chromosomiques de l'oeuf</b>
	<b>Insuffisance du corps jaune</b>
	<b>Endomètre inapte, endométriose</b>

Tableau 2-2. Les principales causes d'hypofertilité chez l'homme

Niveau de l'anomalie	Causes	
Production des gamètes	Nulle	<b>Azoospermie non obstructive</b> : - Cryptorchidie bilatérale - Orchite virale (oreillons) - Causes génétiques (syndrome de Klinefelter)
		<b>Azoospermie obstructive</b> : - Agénésie bilatérale vésiculo-déférentielle - Séquelles d'infection
	Insuffisante	<b>Oligozoospermie</b> : - Cryptorchidie unilatérale - Cause hormonale - Prise de toxiques, de médicaments - autoimmunisations (ACAS)
	Anormales	<b>Térazoospermie</b>
Transit des gamètes	<b>Azoospermie obstructive congénitale</b> : Agénésie bilatérale vésiculo-déférentielle	
	<b>Azoospermie obstructive acquise</b> : Séquelles d'infection	
Troubles de l'éjaculation : anéjaculation, éjaculation rétrograde	<b>Lésions neurologiques</b> (diabète, séquelles de chirurgie de la prostate, accident de la voie publique)	
	<b>Médicaments</b> (psychogènes par exemple)	



# CHAPITRE 3. L'EXAMEN DU COUPLE INFERTILE

## 1. Le bilan féminin d'infertilité

### Interrogatoire

Troubles du cycle, algies pelviennes, fréquence des rapports sexuels, antécédents chirurgicaux abdomino-pelviens, antécédents obstétricaux, DES Syndrome, antécédents médicaux généraux, infectieux, prises médicamenteuses, conduites addictives.

### Examen clinique

Indice de masse corporelle, examen des seins, hirsutisme, l'examen au spéculum, toucher vaginal.

### Examens complémentaires

Courbe de température ou courbe ménothermique,

Test post-coïtal ou test de Hühner,

Échographie pelvienne,

Hystérosalpingographie,

Hystérocopie,

Coelioscopie,

Bilan hormonal féminin (dosage plasmatique de FSH, du  $17\beta$  estradiol, de l'inhibine B, de l'AMH, LH et prolactine),

Caryotype,

Dosages immunologiques.

### 1-1. Interrogatoire

C'est un temps essentiel de la consultation. Il sera recherché :

- **Des troubles du cycle**, tout en faisant préciser l'âge des premières règles, le déroulement de la puberté, la prise passée de contraception ;
- **Des algies pelviennes** : dysménorrhée, dyspareunie (évoquant une endométriose)
- **La fréquence des rapports sexuels**, la durée de l'infertilité, son caractère primaire ou secondaire ;
- **Des antécédents chirurgicaux abdomino-pelviens**, une conisation, une vaporisation au laser, une cryothérapie pouvant modifier la qualité de la glaire cervicale ;
- **Des antécédents obstétricaux** ;
- **Une exposition in utero au diéthylstilboestrol** ou distilbène® (DES Syndrome) ;
- **Des antécédents médicaux** :
  - Généraux : hypertension artérielle, diabète, dysthyroïdie, allergies ;
  - Infectieux : salpingite, condylomes ;
  - Prises médicamenteuses ;
  - Conduites addictives (tabac, alcool, drogue).

## 1-2. Examen clinique

Il s'agit d'un examen général et gynécologique. On recherchera particulièrement :

- **L'IMC (Indice de Masse Corporelle)** afin d'évaluer un surpoids ou un poids insuffisant. Dans les deux cas, il y a un risque de troubles de l'ovulation.
- **À l'examen des seins** une galactorrhée ou une pilosité anormale.
- **Une pilosité anormale** (hirsutisme) sur le thorax, l'abdomen, ou le pubis.
- **Au niveau de la vulve**, des signes d'infection (leucorrhée, écoulement purulent au niveau du méat urinaire).
- **Un hymen intact** suggérerait une perturbation de la vie sexuelle.
- **À l'examen au spéculum :**
  - L'état du col (un frottis est réalisé) ;
  - La qualité de la glaire cervicale ;
  - L'existence de nodules bleutés dans le cul-de-sac vaginal postérieur (endométriose) ;
  - S'il existe des leucorrhées, un prélèvement bactériologique est réalisé (recherche de chlamydiae en particulier).
- **Le toucher vaginal** apprécie :
  - La position de l'utérus ;
  - L'existence de nodules indurés et douloureux dans le cul-de-sac postérieur, évoquant une endométriose ;
  - La présence éventuelle d'une masse annexielle.

## 1-3. Examens complémentaires

### 1-3-A. La courbe de température ou courbe ménothermique

Elle doit être réalisée sur au moins deux cycles successifs (3 à 6 en général). La température est prise le matin au lever. Elle doit permettre de visualiser :

- La régularité des cycles ;
- Un décalage thermique témoin de l'ovulation ;
- Un plateau post-ovulatoire dont on notera la durée (normalement 14 jours).

Toute anomalie de la courbe de température doit faire prescrire un bilan hormonal à la recherche d'une cause de dysovulation.

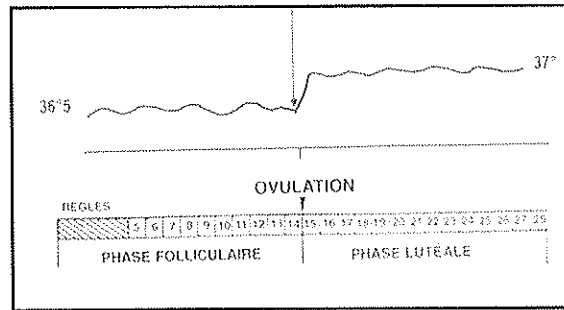


Figure 3-1. Courbe ménothermique.

D'après Reproduction et développement édition Sauramps médical, C. Humeau, 2005

### 1-3-B. Test post-coïtal ou test de Hühner

- **Son objectif** est de vérifier la présence de spermatozoïdes dans la glaire cervicale après un rapport sexuel, mais aussi d'évaluer leur mobilité et leur survie.

Le test doit être réalisé après 3 jours d'abstinence (environ 48 heures avant l'ovulation calculée selon la courbe ménothermique), 3 à 5 heures après un rapport sexuel. Un premier test sera effectué sans traitement afin d'apprécier la qualité de la glaire cervicale en réponse à une stimulation hormonale physiologique. En cas de réponse inadéquate, voire en l'absence de réponse, un prélèvement pourra être effectué sous inducteur de l'ovulation.

- **Plusieurs critères sont alors évalués :**

- L'analyse de la glaire cervicale (ouverture du col, filance, cristallisation, abondance) est appréciée grâce au score d'Insler (de 4 à 12). La glaire sera considérée comme bonne si le score est supérieur à 8.
- Le nombre de spermatozoïdes par champ au microscope à fort grossissement (x100) : on considère le test comme positif s'il y a au moins 4 spermatozoïdes par champ.

### 1-3-C. Étude de la morphologie et de la perméabilité tubaire

- **L'échographie pelvienne**

Cet examen, non invasif, occupe une place prépondérante dans le bilan d'infertilité féminine puisqu'il permet d'étudier :

- Le myomètre (fibromes, malformations utérines) ;
- L'endomètre (épaisseur et vascularisation avec l'index de pulsabilité) ;
- Les ovaires (kyste isolé d'endométriose, ovaires polykystiques) ;
- Les trompes à la recherche d'un hydrosalpinx.

L'écho-sonographie, combinant échographie et instillation d'un liquide dans la cavité utérine et les trompes, permet de combiner les avantages de l'échographie et de l'hystérogographie pour l'évaluation de l'utérus (synéchies, cloisons), des trompes (adhérences, phimosis). Cet examen est réalisé au 2<sup>e</sup> jour du cycle et permet d'évaluer la réserve ovarienne (compte exact et exhaustif des follicules primordiaux).

### ● L'hystérosalpingographie

C'est un examen qui permet d'évaluer :

- La perméabilité tubaire +++++
- Des anomalies congénitales de l'utérus (utérus unicorne, bicorne, cloisonné) ou acquises (myome, polypes, synéchies)



Figure 3-2. Hystérosalpingographie normale

D'après l'AMP en pratique édition Masson J. Lansac et F. Guérif, 2005

### ● L'hystérocopie

La meilleure période au cours du cycle, pour réaliser cet examen à visée diagnostique et/ou thérapeutique, est la période pré-ovulatoire durant laquelle le col est largement ouvert. L'hystérocopie opératoire permet la résection endoscopique d'une cloison, d'une synéchie, d'un polype ou d'un myome.

Une hystérométrie est réalisée dans le même temps (test de transfert).

### ● La coelioscopie

Elle permet de diagnostiquer des lésions intra-pelviennes et d'apprécier la perméabilité tubaire (passage intrapéritonéal de bleu de méthylène injecté au niveau du col).

Elle permet aussi dans le même temps un geste thérapeutique :

- Adhésiolyse ;
- Kystectomie intrapéritonéale ou transpariétale ;
- Plastie tubaire en cas d'hydrosalpinx ou de phimosis ;
- Destruction de lésions d'endométriose.

### **1-3-D. Les examens sanguins**

#### **1-3-D-a. Le bilan hormonal féminin**

Son but est d'évaluer la fonction ovarienne en jugeant des qualités de la folliculogenèse, de l'ovulation et du corps jaune. En dehors des signes d'appel, le bilan consistera en un dosage de FSH et de  $17\beta$  estradiol au 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> jour du cycle. Une élévation de la FSH et/ou du  $17\beta$  estradiol (E2) traduit une insuffisance ovarienne débutante ou prématurée. La réserve ovarienne représentée par les follicules primordiaux est diminuée. Cette insuffisance ovarienne sera confirmée par le dosage de l'inhibine B et de l'AMH (hormone anti-mullérienne) qui seront diminués et ce, couplé à une échographie à J2 du cycle menstruel.

Un dosage de LH élevé évoque un syndrome des ovaires polykystiques. Cela s'accompagne aussi d'une augmentation de la testostérone plasmatique, et cliniquement de spanioménorrhée ou d'aménorrhée et de signes d'hyperandrogénie. L'échographie ovarienne en début de cycle montre de très nombreux petits follicules à la périphérie de l'ovaire.

Un dosage de la prolactinémie plasmatique élevé impose la réalisation d'une IRM hypophysaire à la recherche d'un adénome hypophysaire, après élimination d'une hyperprolactinémie d'origine médicamenteuse (interrogatoire).

Une courbe biphasique avec un plateau trop court évoque une insuffisance lutéale confirmée par un dosage plasmatique de la progestérone pendant la deuxième partie du cycle.

#### **1-3-D-b. Le caryotype**

Il est réalisé dans le cadre d'un bilan de fausses couches à répétition, d'aménorrhées primaires, en cas d'indication de don d'ovocyte. On recherche notamment un syndrome de Turner (formule chromosomique 46, X0 ; fréquence : une fille sur 2500).

#### **1-3-D-c. Dosages immunologiques**

Dans le cadre d'un bilan de fausses couches, on effectuera aussi le dosage de facteurs antinucléaires, des anticorps anticardiopines, la recherche d'un anticoagulant circulant afin de rechercher une pathologie auto-immune.

## 2. Le bilan masculin d'infertilité

### Interrogatoire

Troubles sexuels, antécédents de paternité, antécédents d'oreillons, de cryptorchidie, de torsion, de cure d'ectopie testiculaire, de hernie inguinale, ablation d'un kyste, profession exposant à des toxiques, chaleur, herbicides, pesticides, perturbateurs endocriniens, radiothérapie, chimiothérapie, pathologie générale, conduite addictive.

### Examen clinique urologique

Indice de masse corporelle, pilosité anormale, gynécomastie, cicatrices chirurgicales, examen de la verge, examen du scrotum et des testicules, palpation des testicules, orchidomètre, température scrotale, examen de l'épididyme, examen des canaux déférents.

### Examens complémentaires

#### Le spermogramme :

Examen macroscopique (Viscosité, volume, pH),

Examen microscopique (numération, cellules rondes, agglutinats, vitalité, mobilité, spermocytogramme).

#### Autres examens du sperme :

Test de migration survie (TMS) ou test de capacitation des spermatozoïdes,

Recherche d'anticorps anti-spermatozoïdes (ACAS),

Biochimie du sperme,

Spermoculture,

#### Dosages hormonaux.

#### Echographie scrotale et endorectale.

examens génétiques (caryotype, biologie moléculaire, microdélétions du chromosome Y, mutation du gène CFTR),

#### Biopsie testiculaire.

Autres examens (recherche d'une éjaculation rétrograde, test de pénétration croisée in vitro, microscopie électronique).

### 2-1. Interrogatoire

Il sera recherché à l'interrogatoire :

- **Des troubles sexuels** : perturbation de la libido, de l'érection et de l'éjaculation.
- **Des antécédents de paternité** concernant une grossesse biologique, de fausse-couche avec sa compagne actuelle ou une autre dans le passé.
- **Des antécédents infectieux** : oreillons à la puberté, hépatite B, hépatite C, VIH, tuberculose épididymo-testiculaire, infection aigue à *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, ou *mycoplasmes génitaux* (*Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum*).
- **Des antécédents de cryptorchidie**, de torsion ou traumatisme testiculaire, de varicocèle, de traumatisme au niveau du bassin (accident de la voie publique).

- **Des antécédents chirurgicaux** : cure d'ectopie testiculaire, de hernie inguinale, ablation d'un kyste, antécédents de pathologie du col vésical avec complication à type d'éjaculation rétrograde, antécédents de cancer testiculaire
- **Une profession exposant à des toxiques** susceptibles d'altérer la spermatogenèse :
  - agents physiques : chaleur (boulangier, chauffeur), radiations ionisantes ;
  - agents chimiques : métaux (plomb, cadmium), herbicides, pesticides ;

Plusieurs produits utilisés dans l'industrie ou l'activité agricole peuvent modifier l'action des hormones et sont actuellement soupçonnés d'avoir une responsabilité dans la décroissance de la production des spermatozoïdes chez l'homme ainsi que dans l'augmentation de la fréquence des troubles de l'appareil de la reproduction (cancer du testicule, hypospadias, cryptorchidie), ce sont des perturbateurs endocriniens.

- **Des traitements** en cours ou passés ayant une influence sur les données spermatiques :
  - Radiothérapie ;
  - Chimiothérapie ;
  - Médicaments : antiulcéreux, hypolipémiants, anti-hypertenseurs, lithium, *etc.* ;
- **Une pathologie générale** : un diabète avec trouble de l'érection, une hypertension artérielle ;
- **Une conduite addictive** : tabagisme, alcoolisme, drogues ;
- **Des antécédents familiaux** : différence d'âge dans la fratrie, fausses couches spontanées, prise d'œstrogène chez la mère (DES) durant la grossesse.

## 2-2. Examen clinique

Il s'agit d'un examen général et urologique. Selon les éléments de l'examen clinique, les examens complémentaires (autre que l'examen du sperme) sont indiqués dans le tableau 3-1.

On recherchera particulièrement :

- **Au niveau de l'aspect général** : l'IMC, une pilosité anormale, une gynécomastie, un morphotype longiligne évoquant un syndrome de Klinefelter ;
- **Des cicatrices d'intervention chirurgicale** : hernies inguinales, ectopie testiculaire ;
- **À l'examen de la verge** : recherche d'un hypo- épispadias, d'un phimosis, d'un micropénis ;
- **À l'examen du scrotum et des testicules** :
  - La palpation des testicules peut parfois être gênée par la présence d'une varicocèle, aussi l'examen doit être réalisé sur un sujet debout puis couché. On évaluera la taille des testicules, leur position, leur sensibilité et l'on recherchera

la présence d'une cicatrice ou d'une fistule en dépliant les plis du scrotum. Le volume du testicule est de 15 mL (mesure avec un orchidomètre).

- On peut mesurer la température scrotale avec un capteur thermique appliqué sur la peau scrotale ou avec un thermomètre à mercure spécifique. Plusieurs arguments montrent que la chaleur altère la qualité du sperme. D'une part, il y a une altération du nombre et de la qualité des gamètes produits lors d'une élévation induite de la température corporelle, du scrotum ou des testicules. D'autre part, la température scrotale est anormalement élevée chez environ 40% des hommes inféconds, associée à une réduction quantitative et qualitative de la spermatogenèse et à une augmentation du taux de FSH et de LH sérique.

○ **À l'examen de l'épididyme**, on recherche un kyste, un nodule, une dilatation de l'épididyme en faveur d'une obstruction ou d'une agénésie partielle de l'épididyme (plus ou moins associée à une agénésie complète du déférent et de la vésicule séminale homolatérale) ;

○ **À l'examen des canaux déférents**, on recherchera à la jonction épididymo-déférentielle un nodule témoin d'une infection ancienne. Les canaux déférents sont normalement palpables entre deux doigts (impression d'une fine cordelette). S'ils ne sont pas palpables et que l'épididyme est très dilaté, on évoquera une agénésie bilatérale congénitale des déférents (ABCD) et l'on recherchera une mutation du gène CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*).

○ **La recherche d'une varicocèle** (varice de la veine spermatique) doit être réalisée sur un patient en position debout avec augmentation de volume à la toux (manœuvre de Valsalva) ou de la position couchée à debout (manœuvre d'Ivanissevitch).

○ **À l'examen de la prostate**, on suspectera une prostatite devant la palpation ferme, douloureuse et la disparition du sillon médian.

## 2-3. Examens complémentaires

### 2-3-A. Le spermogramme

Il s'agit de l'examen complémentaire de première intention. Différents paramètres peuvent interagir lors du cycle spermatogénétique (fièvre, prise médicamenteuse) et compte tenu de la durée de la production dans le testicule (74 jours) et du transit dans l'épididyme (14 jours), un délai de trois mois doit être respecté entre la réalisation de deux spermogrammes.

#### ● Le recueil

Il s'effectue au laboratoire par masturbation après un délai d'abstinence de 2 à 5 jours.



## ● L'examen macroscopique

- La viscosité : le sperme est normalement liquéfié au bout d'une demi-heure.
- Le volume est compris entre 2 et 6 mL :
  - En cas d'hypospermie, on envisage un recueil mal effectué, un trouble de l'éjaculation, une anomalie des vésicules séminales, une éjaculation rétrograde (neuropathie diabétique).
  - Une hyperspermie fait penser à une infection des glandes annexes (vésicules séminales, prostate).
- Le pH est compris entre 7,2 et 8. Inférieur à 7, il évoque une atteinte des vésicules séminales (sécrétions basiques). Supérieur à 8, il oriente vers une pathologie prostatique.

## ● L'examen microscopique

- La numération (normalement entre 20 à 200 millions/ml) :
  - Oligozoospermie si concentration inférieure à 20 millions/ml
  - Azoospermie si aucun spermatozoïde n'est retrouvé sur au moins deux spermogrammes à trois mois d'intervalle.
- Les cellules rondes (cellules urétrales, cellules de la lignée germinale et leucocytes)  
Si les cellules de la lignée germinale dépassent 10% de la numération des spermatozoïdes, il peut exister un trouble de la spermatogenèse. Un taux de leucocytes supérieur à 5% est une leucospermie et évoque une infection.
- Les agglutinats incitent à rechercher des anticorps anti-spermatozoïdes.
- La vitalité : La nécrospermie (moins de 60% de spermatozoïdes vivants) évoque une infection.
- La mobilité : selon la classification de l'OMS, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles rapides et progressifs (a) > 25% et/ou progressifs rapides et lents (a+b) > 50%.  
En dessous c'est une asthénozoospermie.

○ Le spermocytogramme évalue les anomalies morphologiques et notamment le pourcentage de forme typique (téatozoospermie en dessous de 30%) et l'index d'anomalies multiples (une valeur supérieure à 1,6 est de mauvais pronostic).

## **2-3-B. Autres examens du sperme**

### **2-3-B-a. Le test de migration survie (TMS) ou test de capacitation des spermatozoïdes**

Ce test permet d'isoler les spermatozoïdes mobiles après capacitation : on évalue leur concentration, puis on estime leur survie après 24 heures en culture.

C'est un examen de deuxième intention programmé devant une anomalie du spermogramme ou du test de Hühner.

### **2-3-B-b. La recherche d'anticorps anti-spermatozoïdes (ACAS)**

Le dépistage se fait avec le Mar test et se confirme avec le test aux immunobilles. Ce test met en évidence des anticorps dirigés contre les spermatozoïdes. Ils peuvent altérer les capacités des spermatozoïdes, la mobilité et les phénomènes de fixation-fusion avec la membrane ovocytaire.

### **2-3-B-c. La biochimie du sperme**

Les marqueurs du plasma séminal témoignent de l'activité des glandes annexes. La biochimie du sperme peut être utile pour diagnostiquer le niveau d'une obstruction ou d'une infection sur les voies excrétrices génitales.

### **2-3-B-d. La spermoculture**

Elle est réalisée systématiquement lors du spermogramme et/ou du TMS. Les principaux germes recherchés sont les germes banals, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Neisseria gonorrhoeae*.

Des cultures polymicrobiennes sont le plus souvent le reflet de sperme contaminé lors du passage dans les voies urinaires alors qu'une culture monomicrobienne nécessitera une identification et un antibiogramme si le nombre de colonies est supérieur ou égal à  $5 \times 10^3$  UFC/mL (*E. coli*, *proteus*) ou  $10^4$  (*Gardnerella vaginalis*, etc.).

Tableau 3-1. Examens complémentaires (autre que l'examen du sperme) indiqués par l'examen clinique

	Anomalies à l'examen clinique	Examens complémentaires
<b>Testicule</b>	- Douleurs, induration localisée - Hypotrophie, atrophie	- Échographie scrotale - Bilan Hormonal
<b>Épididyme</b>	- Kyste	-Échographie scrotale
	- Dilatation épидидymaire avec déférents perçus - Dilatation épидидymaire avec absence partielle d'épididyme et canal déférent absent	-Échographie scrotale -Marqueurs épидидymaire du sperme +/- Exploration chirurgicale
<b>Cordon spermatiqu</b>	- Varicocèle	- Bilan hormonal - Doppler
<b>Scrotum</b>	- Hydrocèle	- Transillumination - Échographie scrotale

### 2-3-C. Les dosages hormonaux

Ils sont indiqués principalement s'il existe une azoospermie ou une oligozoospermie sévère. Il sera fait au minimum un dosage de la FSH et/ou de l'inhibine B. S'il existe des signes d'hypoandrogénie ou une diminution importante de la taille testiculaire, on dosera aussi la testostérone, la LH, le  $17\beta$  estradiol et la prolactine. Les hypogonadismes se traduisant par une baisse des gonadotrophines imposent une exploration de la fonction hypothalamo-hypophysaire et donc au minimum un test au LHRH.

### 2-3-D. Les examens échographiques

#### ● L'échographie scrotale

Elle visualise la masse testiculaire, son volume et sa position. Cet examen permet de mettre en évidence une varicocèle, une hydrocèle, voir une tumeur testiculaire.

#### ● L'échographie endorectale

Elle permet d'explorer les voies génitales dans leur ensemble et surtout de vérifier la présence ou l'absence des canaux déférents.

### 2-3-E. Les examens génétiques

#### ● Le caryotype

Il met en évidence des anomalies de structures (translocations, inversions) à l'origine d'anomalies du sperme.

Il permet aussi de diagnostiquer les anomalies de nombre : le caryotype 47, XXY par exemple, qui peut être associé au syndrome de Klinefelter (azoospermie chez des sujets de morphotype évocateur avec hypoandrogénie).

- **La biologie moléculaire**

Par PCR (Polymérase Chain réaction) ou hybridation in situ ou FISH (fluorescent in situ Hybridation) détecte des anomalies plus fines (délétion, microdélétion, mutation) :

- Les microdélétions du chromosome Y

Cette anomalie est recherchée devant une azoospermie non obstructive (environ 10% de microdélétion) ou toute oligoasthénozoospermie sévère inférieure à 5 millions/ml (environ 5% de microdélétion). Les régions pouvant être délitées sont AZFa, AZFb, AZFc.

- La mutation du gène CFTR

Le gène CFTR peut présenter des mutations habituellement associées à la mucoviscidose. Les azoospermies avec agénésie bilatérale congénitale des déférents (ABCD) sont aujourd'hui considérées comme une forme frustrée de mucoviscidose. 80% hommes avec ABCD sont porteurs de mutation de ce gène. Parmi 500 mutations décrites, les plus fréquentes sont la  $\Delta F508$ , la R117H et l'allèle 5T. C'est une maladie récessive ne s'exprimant qu'à l'état homozygote ou à l'état de double hétérozygote (deux mutations différentes).

### **2-3-F. La biopsie testiculaire**

Dans 40 à 50% des azoospermies non-obstructives, il est possible de retrouver par exploration chirurgicale quelques spermatozoïdes testiculaires. La biopsie testiculaire est aujourd'hui utilisée à titre diagnostique et surtout thérapeutique. L'analyse histologique des biopsies définit plusieurs situations. Notamment, l'absence totale de cellules germinales : c'est le « *Sertoli cell only syndrome* ». Parfois il existe quelques îlots de tubes séminifères avec persistance d'une spermatogenèse normale. Le traitement de la biopsie testiculaire au laboratoire de biologie de la reproduction peut donc isoler des spermatozoïdes utilisés en direct pour l'ICSI ou congelés en paillettes pour une utilisation ultérieure.

### **2-3-G. Autres examens**

- **La recherche d'une éjaculation rétrograde**

Devant une oligo- ou azoospermie avec hypospermie, les spermatozoïdes peuvent être recherchés dans les urines.

- **Le test de pénétration croisée in vitro**

Il permet d'évaluer la responsabilité de la glaire endocervicale ou de l'insuffisance fonctionnelle des spermatozoïdes, voire de l'association des deux lorsqu'un test de Hühner est négatif.

- **La microscopie électronique**

- **L'analyse objective automatisée du mouvement des spermatozoïdes**
- **Le test de fixation à la zone pellucide (*hémi zona assay*)**
- **Test de réaction acrosomique**
- **Test de la maturité nucléaire des spermatozoïdes**

## **PARTIE 2 : L'assistance médicale à la procréation**

# CHAPITRE 4. LA PRATIQUE DE L'AMP

## 1. Les techniques de procréation médicalement assistée : indications et déroulement

### 1-1. L'induction de l'ovulation

C'est une technique utilisée en gynécologie mais non soumise à autorisation spécifique. Ce traitement est prescrit à des patientes présentant un trouble de l'ovulation.

### 1-2. L'insémination artificielle

C'est la plus ancienne des techniques d'AMP. En effet, les premiers résultats ont été publiés en 1789 par Hunter.

#### 1-2-A. Principes

Cette technique a pour objectif de faciliter la rencontre des gamètes mâles et femelles à l'intérieur de l'appareil génital de la femme. La technique la plus répandue est l'insémination intra-utérine (IIU).

L'insémination intra-utérine consiste à introduire instrumentalement les spermatozoïdes dans la cavité utérine, après capacitation. Les techniques de préparation du sperme vont sélectionner une fraction de spermatozoïdes mobiles, capités, permettant de déposer un grand nombre de spermatozoïdes mobiles dans la cavité utérine. Cependant l'IIU, excluant le passage dans le mucus cervical, prive les spermatozoïdes d'un milieu favorable à leur maintien et à leur survie pendant plusieurs jours (plutôt de l'ordre de quelques heures). Ainsi une synchronisation précise entre l'IIU et l'ovulation est nécessaire (stimulation et déclenchement de l'ovulation).

#### 1-2-B. Indications

Les indications se sont considérablement élargies au fil des ans. Plusieurs causes d'infertilité sont parfois associées.

- **Trouble de l'éjaculation** ;
- **Facteur cervical** : trouble de la glaire cervicale en quantité et qualité ; la dysmucorrhée est diagnostiquée devant un test post-coïtal négatif ;
- **Facteur masculin** : oligoasthénotérazoospermie modérée, hypospermie ;
- **Facteur immunologique** : anticorps antispermatozoïdes ;

● **Facteur inexpliqué** : spermogramme normal, test post-coïtal normal, cycle normal, intégrité tubaire et cervicale. L'intérêt théorique de ces inséminations est d'optimiser la fécondité du couple en agissant sur les facteurs masculins (insémination) et féminins (stimulation de l'ovulation). La durée de l'infertilité prend ici toute son importance.

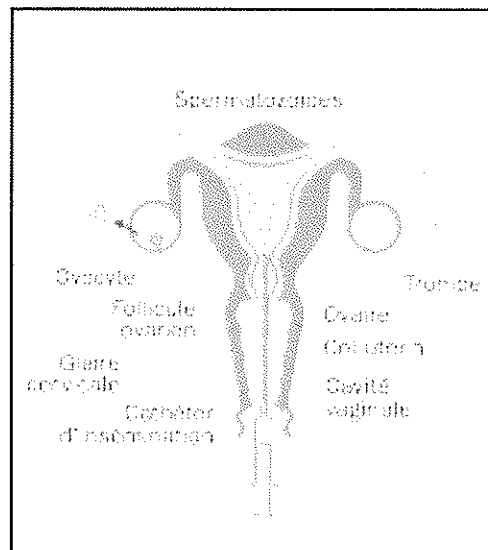


Figure 4-1. L'insémination intra-utérine

Extrait de la notice d'information de l'Agence de Biomédecine

### 1-3. La fécondation *in vitro* (FIV) dite « classique »

La première naissance grâce à une FIV a eu lieu en 1978 en Angleterre : Louise Brown, le "premier bébé-éprouvette". Quatre ans plus tard naissait Amandine en France.

#### 1-3-A. Principes

Cette technique d'AMP cherche à reproduire au laboratoire, la fécondation et les étapes précoces du développement de l'œuf fécondé. À l'intérieur d'une boîte de culture, équivalent moderne de l'éprouvette utilisée aux débuts de la FIV, la rencontre des gamètes est organisée dans un milieu de culture spécifique. Quelques jours après la fécondation, un ou deux embryons obtenus *in vitro* sont transférés dans l'utérus de la patiente (d'où l'ancien terme FIVETE pour fécondation *in vitro* et transfert d'embryon).

Au cours d'une tentative de FIV, les ovaires sont stimulés par des traitements hormonaux pour provoquer la maturation de plusieurs follicules et assurer ainsi la production de plusieurs ovocytes fécondables. Puis l'ovulation est déclenchée par une injection d'HCG (*hormone chorionique gonadotrophin*) qui mime le pic de LH *in vivo*, et permettra d'obtenir des ovocytes fécondables lors de la ponction ovarienne (J0). Ce même jour, le recueil et la capacitation du



sperme sont effectués, puis les gamètes sont mis en contact *in vitro*. À J1, les ovocytes sont examinés afin de déterminer s'ils sont fécondés ou non et si cette fécondation est normale. De J2 à J6, chaque embryon est examiné et typé. Un ou deux embryons seront choisis afin d'être transférés à J2 ou J3, voir à J5 ou J6 jusqu'au stade de blastocyste (culture prolongée). Enfin, les embryons non transférés mais de qualité suffisante pourront être congelés en vue d'un transfert ultérieur.

### 1-3-B. Indications

À l'origine, cette technique était proposée comme réponse à la stérilité tubaire définitive (trompes obstruées, absentes ou non fonctionnelles). Depuis, les indications (parfois associées) se sont étendues :

- À l'endométriose ;
- Aux échecs d'insémination ;
- Aux infertilités inexplicables ;
- Aux anomalies modérées de sperme (oligo-, astheno-, ou térazoospermie modérée).

Malgré les succès enregistrés dans cette dernière indication, les altérations importantes des paramètres du sperme constituaient il y a quelques années, des causes fréquentes d'échec de FIV. En 1992, l'introduction de la technique de micro-injection du spermatozoïde dans l'ovocyte (ou ICSI pour *intracytoplasmic sperm injection*) a révolutionné la prise en charge des infertilités d'origine masculine.

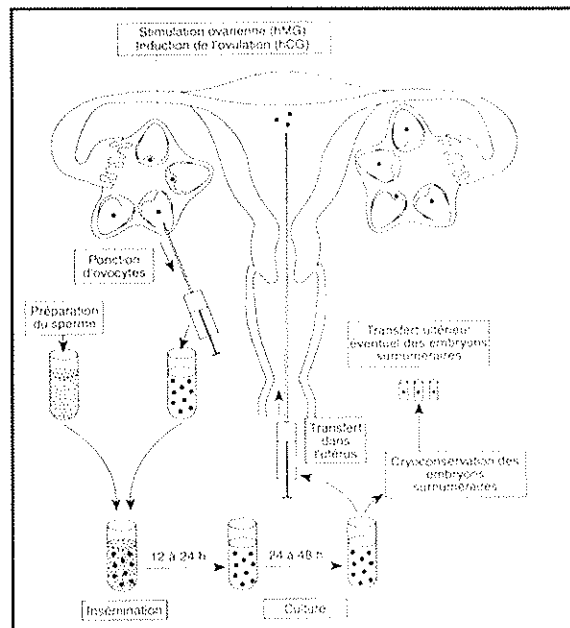


Figure 4-2. La Fécondation in vitro et le transfert des embryons dans l'utérus

D'après biologie de la reproduction humaine éditions Sauramps médical,

J-C. Czyba et A. Montella, 1993

## 1-4. La fécondation *in vitro* avec micro-injection ou ICSI (*Intra-Cytoplasmic Sperm Injection*)

La découverte de l'ICSI est fortuite. En effet, en 1992, le Dr G. Palermo perfore involontairement la membrane plasmique de quelques ovocytes en réalisant la technique de micro-injection de l'époque : la SUZI (*subzonal insemination*). Le lendemain, le taux de fécondation de ces ovocytes est plus élevé que celui des ovocytes soumis à la SUZI. Ainsi apparaît une nouvelle technique : l'ICSI (Palermo *et al.*, 1992). La supériorité de l'ICSI sur la SUZI en termes de résultats fut ensuite confirmée par la même équipe belge sur des séries plus importantes (Van Steirteghem *et al.*, 1993). Depuis 1992, des milliers d'enfants sont nés de l'ICSI. Ainsi en France en 2006, plus de la moitié des tentatives recensées par l'agence de biomédecine a été réalisée par ICSI.

### 1-4-A. Principes

L'ICSI est une FIV avec fécondation assistée. On parle de FIV avec ICSI (opposé à la technique de FIV « classique »). Il n'y a que l'étape de fécondation qui varie par rapport à la FIV classique. Elle consiste à injecter, à l'aide de micromanipulateurs, un spermatozoïde dans le cytoplasme d'un ovocyte en métaphase II.

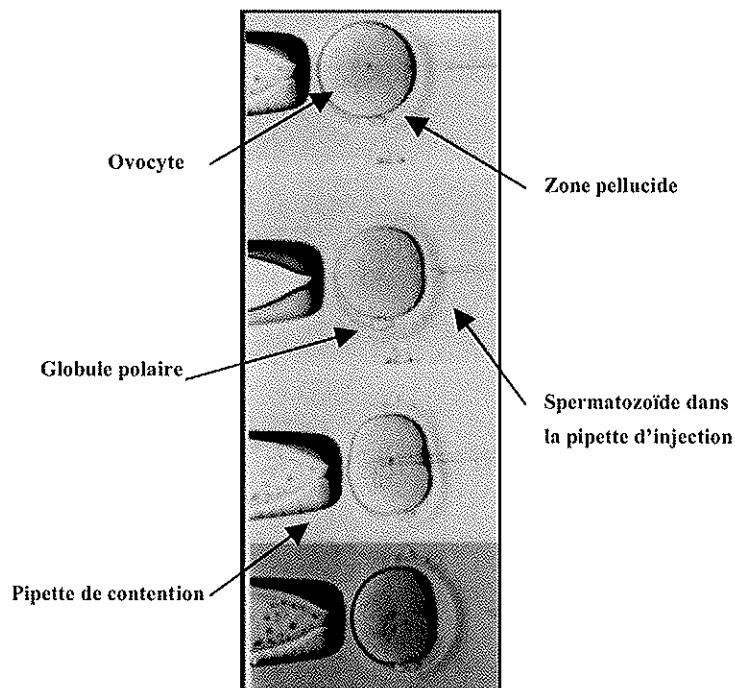


Figure 4-3. Les étapes de l'injection du spermatozoïde dans l'ovocyte lors de l'ICSI  
D'après l'AMP en pratique édition Masson J. Lansac et F. Guérif, 2005

### 1-4-B. Indications

Il pourrait apparaître confortable, en court-circuitant grâce à l'ICSI les étapes initiales de l'interaction gamétique, de se prémunir contre un certain nombre d'échecs de fécondation. Cependant il ne faut pas oublier que le recul historique de l'ICSI remonte seulement à 1992 (contre 1978 pour la FIV classique) et que cette technique est plus invasive. C'est pourquoi le recours à l'ICSI ne doit se baser que sur des indications légitimes et ne doit pas être systématique. Par ailleurs, il a été observé que pour les indications tubaires avec sperme normal (Bukulmez *et al.*, 2000) ou les infertilités inexplicables après échec d'insémination (Ruiz *et al.*, 1997), le recours à l'ICSI n'améliorait pas significativement le taux de fécondation.

Selon le registre FIVNAT, la majorité des indications de recours à l'ICSI est masculine (environ 70% en 2004) associée ou non à un problème féminin. Dans 30% des indications, le recours à l'ICSI est motivé par un échec de fécondation ou paucifécondation lors d'une FIV classique précédente. Il est habituel de distinguer les ICSI en fonction de l'origine des spermatozoïdes injectés (spermatozoïdes éjaculés, épидидymaires ou testiculaires).

#### • ICSI avec spermatozoïdes éjaculés

##### ○ Oligoasthénotératozoospermie

À l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus sur un seuil critique de spermatozoïdes mobiles et normaux en dessous duquel le recours à l'ICSI serait indispensable, ni de test fiable et non invasif pour prévoir la fécondance des spermatozoïdes *in vitro*. En l'absence de données consensuelles, l'indication de FIV classique ou d'ICSI est basée sur des seuils empiriques propres à chaque laboratoire pour les paramètres analysables le jour de la tentative (nombre de spermatozoïdes mobiles et normaux obtenus après capacitation).

##### ○ Asthénozoospermie totale isolée

Dans cette situation, le test hyposmotique permet de distinguer les spermatozoïdes vivants à flagelles incurvés des spermatozoïdes morts.

##### ○ Tératozoospermie totale

##### ○ Anticorps anti-spermatozoïdes

Dans ce cas, il n'y a pas de reconnaissance et de fusion entre l'ovocyte et le spermatozoïde et donc pas de fécondation. Il est préconisé d'avoir recours d'emblée à l'ICSI lorsqu'il y a plus de 70% de spermatozoïdes avec des anticorps fixés.

##### ○ Échec ou paucifécondation en FIV classique

L'ICSI est proposée en seconde intention lors d'échec de fécondation en FIV classique ou lorsque le taux de fécondation est inférieur à 20%.

### • ICSI avec spermatozoïdes épидидymaires ou testiculaires

Le recours à un prélèvement épидидymaire ou testiculaire est réalisé en cas d'azoospermie (obstructive et non-obstructive). Les spermatozoïdes recueillis après chirurgie sont utilisés en ICSI dans le même temps que le geste chirurgical ou congelés pour une utilisation ultérieure.

## 1-5. L'AMP avec tiers donneur

### 1-5-A. Le don d'ovocytes

Le don d'ovocyte est proposé en cas d'absence d'ovocyte accessible à la ponction (dysgénésie gonadique, ovariectomie, ménopause précoce), ou en cas d'anomalie génétique féminine transmissible grave.

Un ovocyte mûr prélevé sur une femme fertile donneuse est fécondé *in vitro* avec le sperme du conjoint de la femme stérile ; L'embryon est ensuite transplanté dans l'utérus de la patiente stérile, selon les étapes identiques à celles de la FIV. Lorsque les ovaires de la receveuse ne sont pas fonctionnels, un traitement hormonal substitutif, mimant la séquence oestrogène-progestative d'un cycle normal est nécessaire et sera maintenu jusqu'au relais des sécrétions hormonales assurées par le placenta vers le quatrième mois.

### 1-5-B. Le don de sperme

Le sperme congelé utilisé provient de centres agréés CECOS (Centre d'étude de la conservation des œufs et du sperme) qui recrutent des donneurs de sperme. Ces dons permettent de faire des inséminations intra-utérines (IAD) ou des fécondations *in vitro* (FIV-D). L'utilisation du sperme de donneur est indiquée dans les azoospermies ou les maladies héréditaire grave transmissible par l'homme.

### 1-5-C. Le don d'embryon

Il est envisageable quand il y a un cumul des deux causes précédentes, à condition que la conjointe ait un utérus normal, mais aussi en cas de risque de transmission génétique par les deux conjoints ou la conjonction d'une stérilité et d'une anomalie génétique.

En France chaque année, il y a environ 3000 demandes de dons de spermatozoïdes, environ 300 demandes de dons d'ovocytes, et quelques dizaines de demandes de dons d'embryons.

## **2. L'organisation de l'AMP en France**

### **2-1. Le CECOS (Centre d'étude de la conservation des œufs et du sperme)**

Dès 1973, l'insémination artificielle avec sperme de donneur a été organisée sous l'impulsion de G. David, fondateur de la fédération des CECOS. Cette fédération réunit depuis 1981 un réseau de 20 centres intégrés à des services de médecine et de biologie de la reproduction dans des centres hospitalo-universitaires. Chaque centre fonctionne selon les mêmes règles (médicales et éthiques), en équipes pluridisciplinaires comportant des biologistes, des généticiens, des cliniciens et des psychologues. La coordination est assurée par la fédération française de CECOS qui comporte des commissions nationales d'éthique, de génétique, psychologique, scientifique et administrative.

### **2-2. Le GEFF, le BLEFCO puis le registre FIV-NAT**

En 1982, c'est la première naissance française après fécondation *in vitro* et la technique se développe rapidement et apparaît la nécessité de créer une structure de coordination. En 1987, c'est la création du groupe d'étude de la FIV en France (GEFF) puis de la fédération des biologistes pour l'étude de la fécondation *in vitro* en France et la conservation des œufs (BLEFCO) ainsi que la création de FIV-NAT, fichier national contrôlé par l'INSERM. Ce fichier recense les tentatives envoyées cas par cas, avec le suivi de la grossesse jusqu'à l'accouchement. 80% des tentatives sont effectivement recensées, car la participation au fichier est facultative.

### **2-3. La loi de bioéthique du 29 juillet 1994 modifiée le 6**

**Août 2004**

En avril 1988, les pouvoirs publics inquiets de la multiplication des centres, du nombre de tentatives réalisées, décident de réglementer cette activité et publient les décrets instituant la Commission Nationale de la Médecine et de Biologie de la reproduction. Celle-ci a pour mission de faire l'inventaire de l'activité d'AMP en France et d'agréeer les centres cliniques. Même si le conseil national d'éthique émet des avis en matière d'AMP depuis 1984, la France s'est dotée le 29 juillet 1994, d'une loi relative au respect du corps humain, au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic anténatal.

Cette loi dite de « bioéthique » donne un cadre juridique clair à la pratique d'assistance médicale à la procréation : « L'homme et la femme formant le couple doivent être vivants, en âge de procréer, mariés ou en mesure d'apporter la preuve d'une vie commune d'au moins deux ans. » (Art. L.2141-2).

Le principe de la non-commercialisation des produits du corps humain, de la gratuité et de l'anonymat est affirmé. L'accueil de l'embryon sans projet parental par un autre couple est autorisé, ainsi que le diagnostic pré-implantatoire. Les demandes des femmes seules, des couples homosexuels, des femmes âgées et ménopausées sont écartées de même que les inséminations ou les transferts d'embryon post-mortem sont interdits.

La loi reconduit la commission nationale de la médecine et de la biologie de la reproduction dont la composition modifiée comporte un clinicien et un biologiste du GEFF, du CECOS et des BLEFCO. Les centres doivent tous les ans envoyer leurs résultats et redemander leur agrément tous les cinq ans. Un agrément spécifique doit être obtenu pour les ICSI et les prélèvements testiculaires. En 1996, 88 centres cliniques et 80 centres biologiques ont été agréés. Un guide des bonnes pratiques cliniques et biologiques en assistance médicale à la procréation est publié au journal officiel de 1999 et modifié deux ans plus tard (J.O. Numéro 112 du 15 Mai 2001, page 7735).

La loi de bioéthique est revue par l'Assemblée Nationale en mai 2004 et l'Agence de Biomédecine (ABM) est installée en mai 2005.

## **2-4. L'Agence de Biomédecine**

Née de la loi de bioéthique de 2004, l'ABM est la seule entité en Europe rassemblant ces quatre domaines que sont le prélèvement et la greffe, la procréation, l'embryologie et la génétique humaines.

Elle se voit notamment confier les missions suivantes :

- Suivre, évaluer et contrôler les activités biologiques relevant de ses compétences et veiller à leur transparence. Participer à l'élaboration de la réglementation des activités relevant de ses prérogatives et notamment au niveau de l'assistance médicale à la procréation.
- Agréer les praticiens réalisant de l'assistance médicale à la procréation, du diagnostic prénatal et du diagnostic préimplantatoire.
- Promouvoir le don de gamètes.

### **3.Épidémiologie : Bilan de l'agence de biomédecine en 2006**

Ce bilan sert de référence puisque L'ABM est l'organisme officiel qui centralise et analyse les résultats obtenus en France par tous les centres d'AMP dans un rapport d'activité annuel obligatoire.

#### **3-1. Bilan général 2006**

Il s'agit du troisième rapport d'activité de l'ABM décrivant les résultats nationaux de l'AMP.

Quelques chiffres clés de l'AMP :

- 119 000 tentatives ont été réalisées pendant l'année 2006, comprenant différentes techniques, inséminations, FIV « classique » et FIV avec ICSI, et transfert d'embryons congelés issus des FIV et des ICSI. Dans 6% des cas, la tentative d'AMP fait appel à des spermatozoïdes ou des ovocytes issus d'un don.
- Les inséminations artificielles, quel que soit l'origine du sperme, occupent toujours une place importante, avec plus de 54 000 cycles dans l'année.
- Les fécondations in vitro (FIV et ICSI) représentant plus de 65 000 cycles en 2006 sont réalisées par ICSI dans 60% des cas. Cette part d'ICSI a légèrement augmenté ces dernières années.
- Aux tentatives de FIV et d'ICSI viennent s'ajouter 14 300 cycles de transferts d'embryons congelés.

En comparant les précédents rapports, on peut noter une légère tendance à l'amélioration des taux de grossesse pour l'ensemble des techniques d'AMP, qui semble se confirmer par une augmentation des taux d'accouchements. Malgré une politique de transfert plus prudente (2 embryons par transfert en moyenne), le taux d'accouchements multiples reste supérieur à 20%. Les tentatives de l'année 2006 ont conduit à la naissance de 20 042 enfants ce qui représente, comme l'année précédente, 2,4% des naissances enregistrées par l'INSEE (Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques) la même année en France (figure 4-4). Les tentatives sont évaluées par le taux de grossesses échographiques. Dans la figure 4-5, ce taux est présenté pour chaque type de technique d'AMP (hors don de sperme, d'ovocyte et d'embryon). Une tentative correspond soit à un cycle d'insémination artificielle, soit à une ponction d'ovocytes dans le cadre des FIV et des ICSI, soit à un transfert d'embryons congelés.

### Quelques chiffres clés en 2006

- 830 288 naissances en France, toutes naissances confondues. Au total, 20 042 enfants sont nés vivants après AMP, soit 2,4% des naissances.
- 119 000 tentatives ont été réalisées pendant l'année 2006.
- 65 470 cycles de FIV et d'ICSI (le cycle étant l'ensemble des traitements de prise en charge d'une femme lors d'une tentative : une même femme peut suivre au maximum 2 ou 3 cycles de FIV par an), 14 300 cycles de transferts d'embryons congelés et 14 055 enfants sont nés après FIV et ICSI.
- 54 000 cycles d'insémination artificielle et 5987 enfants nés après insémination artificielle.

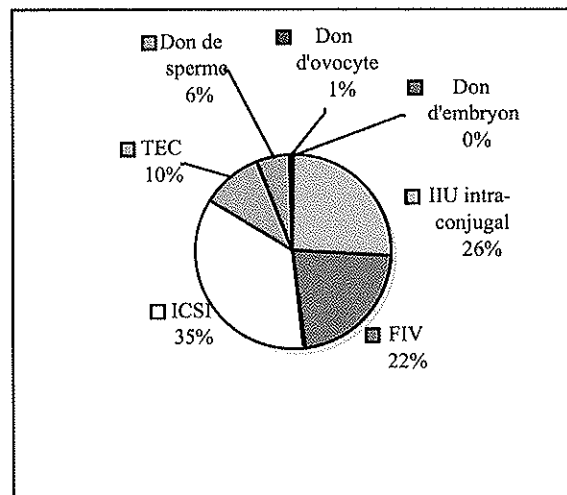


Figure 4-4. La part des enfants nés après AMP en 2006 en fonction de la technique et l'origine des gamètes (n= 20 042) selon l'ABM

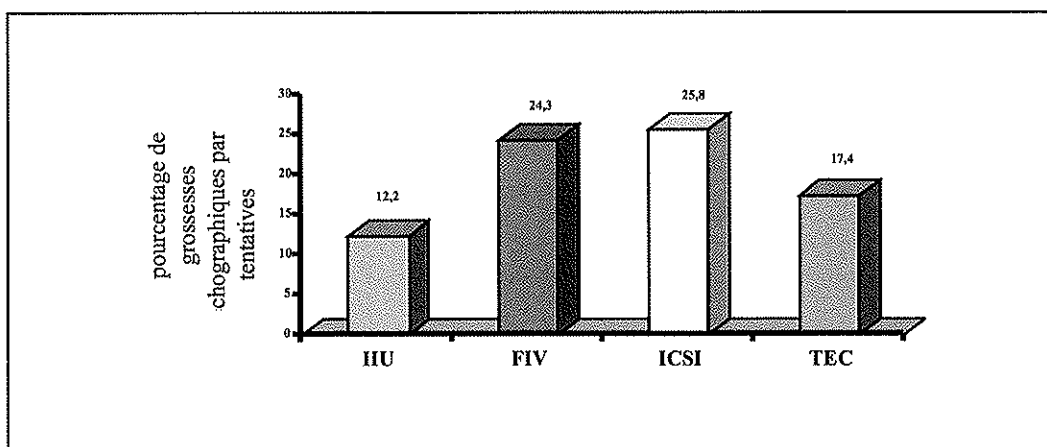


Figure 4-5. Taux de grossesses échographiques après tentative d'AMP intra-conjugale en fonction la technique selon l'ABM



## 3-2. Bilan 2006: FIV classique et ICSI

### 3-2-A. Fécondation in vitro classique

En 2006, 40% des cycles de FIV sont des FIV classiques. Le nombre moyen d'embryons par transfert est stable (n=2). Le pourcentage de transferts de plus de deux embryons diminue à 15,8%. Malgré une politique de transfert embryonnaire plus prudente, le taux d'accouchements gémellaires reste cependant supérieur à 20%. Un nouvel indicateur apparaît dans ce rapport : le taux d'implantation qui représente les chances moyennes qu'un embryon transféré s'implante : il est de 16% en moyenne.

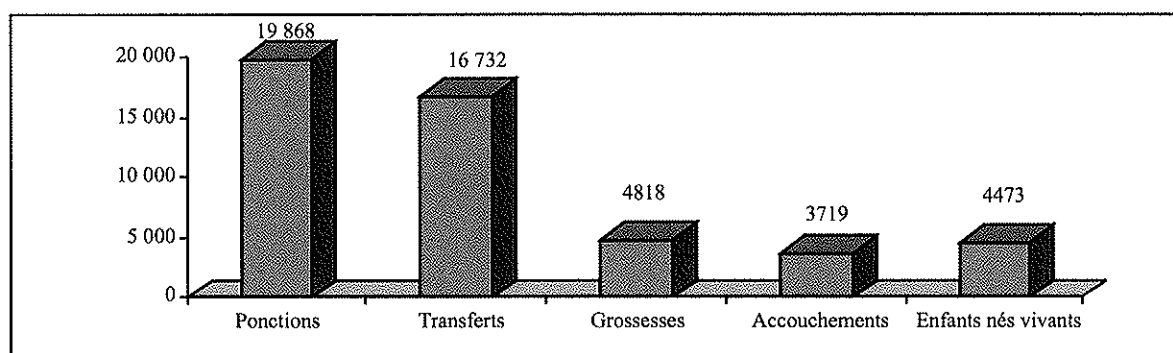


Figure 4-6. Chiffres des FIV classiques intraconjugales en 2006 selon l'ABM

Tableau 4-1. Évolution entre 2003 et 2006 des grossesses, issues de grossesse et accouchements en FIV classique intra-conjugale selon l'ABM

	2003	2004	2005	2006
<b>Nombre de ponctions</b>	20 971	21 136	20 923	19 868
<b>Transfert</b>				
% Transferts/ponction	83,8%	84,5%	84,1%	84,2%
% Issues transferts inconnues	ND	ND	ND	0,1%
<b>Grossesses</b>				
% Grossesses/ponctions	22,0%	22,6%	23,0%	24,3%
% Grossesses/transfert	26,2%	26,7%	27,3%	28,8%
% Réductions embryonnaires/grossesse*	0,5%	1,0%	0,6%	0,4%
% Grossesses évolutives/ponction	17,1%	17,6%	18,0%	19,4%
<b>Issues de grossesses</b>				
% FCS précoce et GEU/grossesse*	22,2%	21,9%	21,8%	20,7%
% FCS tardives/grossesse*	1,0%	1,2%	1,4%	1,3%
%IMG/ grossesse*	ND	ND	ND	0,9%
% Issues grossesses inconnues	ND	ND	ND	0,7%
<b>Accouchements</b>				
% Accouchements/ponction	16,5%	17,0%	17,3%	18,7%
% accouchements/transfert	19,7%	20,1%	20,5%	22,2%
% Accouchements/grossesse	75,0%	75,3%	75,3%	77,2%
% Accouchements uniques/accouchement	77,5%	77,0%	78,8%	78,2%
% Accouchements gémellaires/accouchement	21,9%	22,4%	20,5%	21,4%
% Accouchements triples et plus/ accouchement	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%
% Issues d'accouchements inconnues	ND	ND	ND	0,0%

\* 2003-2005 : Grossesses cliniques et 2006 ; Grossesses échographiques ; IMG : interruption médicale de grossesse ;

ND : données non disponibles.

### 3-2-B. FIV avec ICSI

Le nombre d'ICSI augmente régulièrement au cours de ces dernières années et atteint 60% de l'ensemble des fécondations *in vitro*. Lors de la ponction ovocytaire, plus de 78% des femmes avaient moins de 38 ans. La part des ICSI réalisées avec des spermatozoïdes recueillis au niveau épидидymaire ou testiculaire est stable, de l'ordre de 6 à 7%.

Comme en FIV classique, le taux de grossesse et d'accouchement semble s'améliorer en 2006 par rapport aux années précédentes. Le nombre moyen d'embryons par transfert est stable (n=2). On observe une diminution discrète mais régulière des accouchements multiples. On note un taux d'implantation à 16,1%, comparable à celui trouvé en FIV classique. Les résultats de 2006 des ICSI sont illustrés dans la figure 4-7 et l'évolution de 2003 à 2006 est résumée dans le tableau 4-2.

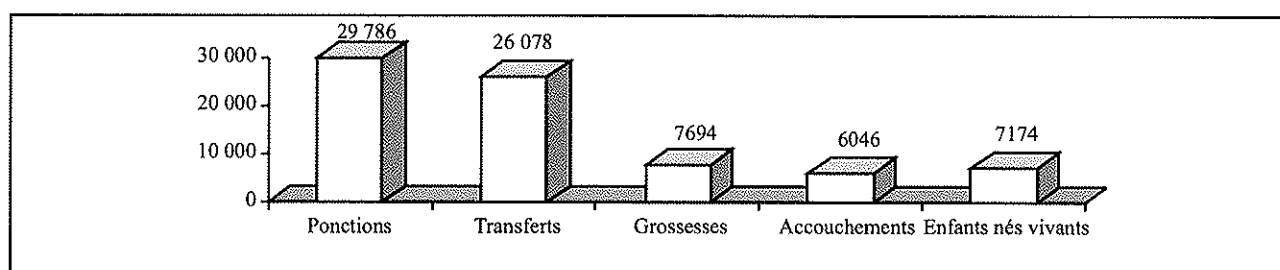


Figure 4-7. Chiffres des ICSI intraconjugales en 2006 selon l'ABM

Tableau 4-2. Évolution entre 2003 et 2006 des grossesses, issues de grossesse et accouchements en ICSI intra-conjugale selon l'ABM

	2004	2005	2006
<b>Nombre de ponctions</b>	<b>27 909</b>	<b>29 634</b>	<b>29 786</b>
% Transferts/ponction	89,5%	89,5%	87,6%
% Issues transferts inconnues	ND	ND	0,8%
<b>Grossesses</b>			
% Grossesses/ponctions	22,9%	24,4%	25,8%
% Grossesses/transfert	26,7%	27,3%	29,5%
% Réductions embryonnaires/grossesse*			0,4%
% Grossesses évolutives/ponction	18,9%	19,7%	21%
<b>Issues de grossesses</b>			
% FCS précoce et GEU/grossesse*	20,6%	19,7%	19,6%
% FCS tardives/grossesse*	1,1%	1,1%	1,1%
% IMG/ grossesse*	ND	ND	0,6
% Issues grossesses inconnues	ND	ND	1,3%
<b>Accouchements</b>			
% Accouchements/ponction	18,3%	18,9%	20,3%
% Accouchements/transfert	20,4%	21,1%	23,2%
% Accouchements/grossesse	75,3%	75,3%	77,2%
% Accouchements uniques/accouchement	77,7%	78,8%	80,1%
% Accouchements gémeaux/ accouchement	21,8%	20,6%	19,3%
% Accouchements triples et plus/ accouchement	0,5%	0,5%	0,5%

\* 2003-2005 : Grossesses cliniques et 2006 : Grossesses échographiques ; IMG : interruption médicale de grossesse ;

ND : données non disponibles.

# **CHAPITRE 5. ASPECTS CLINIQUES ET TECHNIQUES DE L'AMP**

Ce chapitre ne détaille que les étapes de FIV sans et avec ICSI (les inséminations et les TEC n'étant pas le sujet de ce travail).

## **1. La prise en charge des couples et le déroulement d'une tentative**

### **1-1. Le bilan d'infertilité**

D'une manière générale, les couples consultent tout d'abord le gynécologue du centre d'AMP pour infertilité. Le délai nécessaire à concevoir est considéré comme pathologique au-delà de 2 ans. Toutefois, l'âge des partenaires peut modifier cette attitude et réduire le délai (surtout après 35 ans).

Un bilan diagnostique préalable complet des deux conjoints ainsi qu'un bilan infectieux est réalisé : sérologie virale (hépatite B, hépatite C, HIV) et bactérienne (syphilis) pour les deux membres du couple. Plus spécifiquement chez la femme, l'immunité contre la rubéole et la toxoplasmose est évaluée, et un prélèvement vaginal bactériologique et un frottis cervico-vaginal sont réalisés. Chez l'homme, un prélèvement bactériologique urétral et un examen cytobactériologique urinaire peuvent être réalisés. Enfin, concernant le bilan masculin, un test de migration survie doit être fait dans le laboratoire du centre d'AMP où aura lieu les tentatives.

### **1-2. Les formalités administratives**

Les patients sont tenus de signer des consentements concernant la prise en charge en AMP et des démarches administratives doivent être menées auprès de la caisse de sécurité sociale pour la prise en charge (100% jusqu'à la quatrième tentative).

### **1-3. Choix de la technique**

Au vu du bilan clinique, biologique et d'imagerie, la technique de prise en charge (FIV ou ICSI) est décidée par les gynécologues et les biologistes du centre.

## 1-4. La consultation de biologie

Une fois la technique décidée, le biologiste qui voit en consultation le couple fournit toutes les informations concernant la FIV ou l'ICSI et recueille le consentement éclairé des patients.

## 1-5. Le déroulement d'une tentative

Une tentative débute avec la stimulation hormonale et se termine avec le transfert embryonnaire et la congélation éventuelle des embryons surnuméraires (au 3<sup>e</sup> ou au 5<sup>e</sup> jour). Les différentes étapes sont détaillées dans les paragraphes suivants et illustrées sur la figure 5-1.

- Assurer une croissance et une maturation adéquates de plusieurs follicules ovariens contrôlés par : des dosages hormonaux sanguins (17 $\beta$  estradiol et éventuellement LH et progestérone) et des examens échographiques (taille, nombre de follicules ovariens).
- Déclencher la maturation finale des ovocytes par une injection d'HCG (activité LH *like*).
- Aspirer les ovocytes par ponction des follicules sous échographie avant leur expulsion naturelle.
- Rechercher les ovocytes dans les liquides folliculaires.
- Effectuer la capacitation du sperme parallèlement.
- Obtenir des embryons soit par FIV classique soit avec ICSI.
- Cultiver in vitro des embryons.
- Transférer le ou les embryons dans la cavité utérine (à J2, J3, J5 ou J6).
- Congeler des embryons surnuméraires.

Deux semaines après la tentative, la patiente effectue un test de grossesse (Dosage plasmatique des  $\beta$ -HCG). Si le test est négatif et que des embryons ont été congelés, la patiente bénéficiera de un ou plusieurs transferts d'embryon congelé.

S'il n'y a pas d'embryons congelés à transférer, la patiente pourra bénéficier d'une autre tentative deux ou trois mois plus tard. Les couples peuvent ainsi bénéficier de plusieurs tentatives.



le follicule dominant. La synthèse de la LH par l'hypophyse est elle aussi sous contrôle de la GnRH. La LH est responsable de l'ovulation et de la sécrétion post-ovulatoire de progestérone. L'estradiol et la progestérone régulent, par rétrocontrôle, la sécrétion des gonadotrophines constituant ainsi la structure fondamentale de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

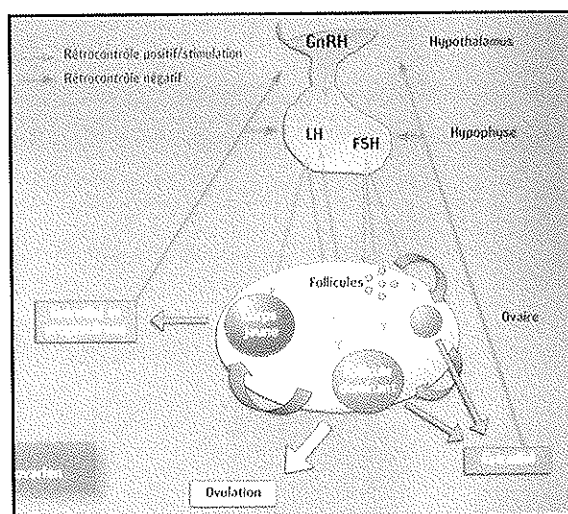


Figure 5-2. L'axe hypothalamo-hypophysaire ovarien  
Extrait de la notice d'information conçue par Génévrier Biotechnologie

Plusieurs types de protocoles de stimulation sont utilisés et dépendent du mode d'utilisation des agonistes et des antagonistes du GnRH (tableau 5-1).

### 2-1-B. Utilisation des agonistes du GnRH

Après l'administration d'agonistes du GnRH, il existe une première phase de libération de LH et de FSH (effet « *flare-up* »), suivie d'une phase de désensibilisation de l'hypophyse correspondant à l'effondrement de la LH et de la FSH qui entraînera une baisse d'estradiol et de progestérone. On distingue les protocoles dits longs ou courts :

- **Dans le protocole long**, on attend la désensibilisation pour démarrer la stimulation par les gonadotrophines. L'administration de l'agoniste se fait en début de cycle. On s'assure au bout de 13 jours de la désensibilisation par une échographie et la mesure de l'estradiolémie; Si le taux d'estradiol est inférieur à 50 pg/mL (selon les standards propres à chaque laboratoire), la stimulation démarre et les contrôles peuvent être effectués après 6 à 10 jours de traitement.
- **Dans le protocole court**, l'agoniste est démarré au début du cycle, et l'on utilise « l'effet *flare-up* » pour initier la stimulation en prenant le relais par la FSH.

Le protocole long semble donner de meilleurs résultats.

ETAPE DE LA STIMULATION OVARIENNE	MOLECULE ET NOM COMMERCIAL		EFFETS SECONDAIRES	
Désensibilisation de l'hypophyse	Agonistes du GnRH	<i>Décapeptyl</i> <sup>®</sup> (Beaufour Ipsen, Boulogne, France), <i>Synarel</i> <sup>®</sup> (Pfizer, Paris, France) <i>Enantone</i> <sup>®</sup> (Takeda, Puteaux, France)	- Bouffées de chaleur - Céphalées - Réactions locales au point d'injection	
	Antagonistes du GnRH	<i>Cétrotide</i> <sup>®</sup> (Merck Serono, Lyon, France) <i>Orgalutran</i> <sup>®</sup> (Schering Organon, Puteaux, France)		
Recrutement, croissance et maturation de plusieurs follicules	FSH ( <i>follicule stimulating hormone</i> )	Urinaire (HMG, <i>human menauposal gonadotrophin</i> )	<i>Menopur</i> <sup>®</sup> (Ferring, Saint-Prex, Suisse) <i>Fostimon</i> <sup>®</sup> (Genevrier, Antibes, France)	- Hyperstimulation ovarienne : douleurs pelviennes, voir épanchement abdominal, pleural voir péricardique et complications de l'hypovolémie et trouble de la coagulation
		Recombinante	<i>Gonal-F</i> <sup>®</sup> (Merck Serono, Lyon, France) <i>Puregon</i> <sup>®</sup> (Schering Organon, Puteaux, France)	
Déclenchement de l'ovulation	HCG ( <i>hormone chorionic gonadotrope</i> )	Urinaire	<i>Gonadotrophine chorionique Endo</i> <sup>®</sup> (Schering Organon, Puteaux, France)	
		Recombinante	<i>Ovitrelle</i> <sup>®</sup> (Merck Serono, Lyon, France)	

Tableau 5-1. Tableau des différentes molécules utilisées pour la stimulation ovarienne

### 2-1-C. Utilisation des antagonistes du GnRH

L'antagoniste entre en compétition avec la molécule endogène sur les récepteurs hypophysaires au GnRH. L'inhibition de la sécrétion est alors dose-dépendante, sans effet flare-up. Ces molécules, plus récentes permettent de prévenir ou d'interrompre le pic de LH. La désensibilisation hypophysaire n'est pas nécessaire et les antagonistes peuvent être utilisés en milieu ou en fin de phase folliculaire. Le protocole *Cétrotide*<sup>®</sup> est un exemple de protocole antagoniste.

Figure 5-3. Les trois principaux protocoles utilisés pour la stimulation ovarienne lors d'une tentative

Protocole Cétrotide					
Jours	× FSH	● Antagoniste	← hCG	* Dosage E2 et LH	□ Échographie
1	Premier jour des règles				
2	×				
3	×				
4	×			*	
5	×			*	
6	×			*	□
7	×			*	
8	×			*	□
9	×	●		*	
10	×	●		*	
11	×	●		*	
12	×	●		*	□
13		●	←	*	
14				*	
15	Ponction de follicules				
16					
17	Transfert d'embryons				
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28	Dosage βhCG				

Protocole Long					
Jours	× FSH	● Agoniste	← hCG	* Dosage E2	□ Échographie
1	Premier jour des règles				
2		●			
3		●			
4		●			
5		●			
6		●			
7		●			
8		●			
9		●			
10		●			
11		●			
12		●			
13		●		*	□
14		●			
15		●			
16		●		*	□
17	×	●			
18	×	●			
19	×	●			
20	×	●		*	
21	×	●			
22	×	●		*	
23	×	●		*	
24	×	●		*	□
25	×	●		*	
26	×	●		*	
27	×	●		*	
28	×	●	↓	*	□
29				*	
30	Ponction de follicules				
31					
32	Transfert d'embryons				
33					
34					
35					
36					
37					
38					
39					
40					
41					
42					
43	Dosage βhCG				

Protocole Court					
Jours	× FSH	● Agoniste	← hCG	* Dosage E2	□ Échographie
1	Premier jour des règles				
2	×	●			
3	×	●		*	
4	×	●		*	□
5	×	●		*	
6	×	●		*	
7	×	●		*	
8	×	●		*	
9	×	●		*	□
10	×	●		*	
11	×	●		*	
12	×	●	←	*	□
13				*	
14	Ponction de follicules				
15					
16	Transfert d'embryons				
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28	Dosage βhCG				



## 2-1-D. Le choix du protocole de stimulation

Il est déterminé à partir des éléments du dossier médical (bilan hormonal féminin, indications, antécédents, résultats des tentatives précédentes, *etc.*). Les patientes à risque d'être mauvaises répondeuses ont une FSH élevée mais dans la normalité (entre 5 et 12 UI/mL selon les standards propres à chaque laboratoire), et l'estradiolémie est élevée alors que l'AMH et l'inhibine B sont inférieurs à la normal. Quant aux quantités de FSH utilisées, les posologies sont adaptées au monitoring et aux résultats des cycles antérieurs.

Tableau 5-2. Les avantages, inconvénients, et indications des trois principaux types de protocole.

TYPE DE PROTOCOLE	AVANTAGES	INCONVENIENTS	INDICATIONS
<b>Protocole long</b> (considéré comme le « <i>gold standard</i> »)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bonne reproductibilité d'un cycle à l'autre chez la même patiente</li> <li>- Bons résultats dans la plupart des indications</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Effets secondaires de la freination gonadique : fatigue, bouffées de chaleur, sécheresse vaginale</li> <li>- Coûts élevés en raison d'une consommation élevée de FSH</li> <li>- Durée du traitement et nombre d'injections importantes</li> <li>- Développement de kystes ovarien et risque élevé d'hyperstimulation ovarienne</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Surtout les ovaires normaux et le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK)</li> <li>- Peu recommandé pour les patientes « mauvaises répondeuses »</li> </ul>
<b>Protocole court</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible durée de traitement et coût inférieur</li> <li>- Faible consommation de gonadotrophines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessité d'un monitoring plus important avec potentiellement plus d'adaptation de doses</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protocole mieux adapté aux patientes à risque de réponse insuffisante</li> <li>- Non recommandé pour le SOPK</li> </ul>
<b>Protocole Cétrotide®</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Action immédiate sur l'hypophyse donc pas de désensibilisation nécessaire au préalable</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ovaires normaux</li> <li>- SOPK</li> <li>- Mauvaises répondeuses</li> </ul>

## 2-2. La surveillance de la croissance folliculaire

Ce suivi permet d'adapter la posologie quotidienne à la réponse ovarienne, et de repérer le meilleur moment du déclenchement de l'ovulation.

### 2-2-A. Surveillance échographique des ovaires

Les contrôles échographiques se font à des moments différents selon le protocole utilisé. Cet examen permet d'évaluer le nombre de follicules en croissance, leur taille et le caractère

homogène ou non de la cohorte et de vérifier l'absence de kyste ovarien. Puis les contrôles successifs vont permettre :

- de mesurer le diamètre des follicules en voie de maturation ;
- d'évaluer le risque d'hyperstimulation ;
- de préciser la localisation des ovaires dans le pelvis.

### **2-2-B. Surveillance hormonale**

Le dosage plasmatique du  $17\beta$  estradiol (E2) est un caractère essentiel de la surveillance de la stimulation ovarienne. En théorie, plus les follicules sont nombreux et volumineux, plus la quantité d'estradiol retrouvé dans le sang est importante. Le rythme de dosage devient quotidien après quelques jours de traitement. Il est important de suivre l'estradiolémie pour adapter la quantité de FSH administrée. D'une manière générale, une évolution progressive et constante de l'estradiol est souvent en faveur d'une croissance folliculaire satisfaisante et constitue donc un critère de bon pronostic pour la qualité ovocytaire.

Le dosage plasmatique de la LH est indispensable pour les protocoles avec antagoniste (prévention de l'ovulation spontanée).

### **2-3. Le déclenchement de l'ovulation**

Lorsque les données échographiques confrontées aux dosages hormonaux sont cohérentes et fournissent une estimation satisfaisante du degré de maturité des follicules, il convient de déclencher l'ovulation. À la fin du protocole de stimulation et avant le recueil ovocytaire, les effets de la LH doivent être reproduits pour assurer la maturation nucléaire et cytoplasmique des ovocytes à l'intérieur des follicules. On utilise l'HCG (*LH like*) qui assure la maturation des ovocytes mais aussi la rupture du follicule.

Dans la mesure où l'expulsion de l'ovocyte intervient 38 à 40 heures après l'injection d'HCG, la ponction folliculaire est prévue 35 heures après (avant l'heure théorique de l'ovulation).

Classiquement, la décision de déclenchement est prise lorsque au moins trois follicules atteignent un diamètre de 15 à 18 mm (avec la FSH recombinante) ou un diamètre de 20 à 25 mm (avec de l'HMG). L'autre condition est une estradiolémie cohérente avec l'ensemble des images folliculaires (sécrétion d'estradiol par follicule de plus de 14 mm de diamètre entre 200 et 250 pg/mL avec l'HMG et entre 150 à 200 pg/mL avec la FSH recombinante, selon les standards propres à chaque laboratoire).

### 3. La ponction folliculaire et le recueil des ovocytes

La ponction des follicules est réalisée au bloc opératoire, le plus souvent sous sédation. Sous contrôle échographique, une aiguille couplée à la sonde vaginale traverse la paroi postérieure du vagin et aspire le contenu de tous les follicules d'une taille supérieure à 10 mm sur chaque ovaire.

Dans beaucoup de centres, la salle de ponction et le laboratoire de FIV sont contigus. À travers un « passe-plat », les seringues de liquide folliculaire sont confiées l'une après l'autre, au biologiste. Si le laboratoire n'est pas situé au même étage ou s'il est dans une autre structure, les seringues sont transportées à 37°C dans une valise thermostatée.

Sous une loupe binoculaire, le biologiste examine le liquide folliculaire à 37°C à l'abri de la lumière. Les complexes cumulo-ovocytaires sont transférés dans une boîte de culture et placés en incubateur en attendant l'insémination.

En pratique, la ponction folliculaire nécessite une journée d'hospitalisation. Après l'intervention, le biologiste informe le couple du nombre d'ovocytes recueillis et fécondables. Dans certains cas, aucun ovocyte fécondable n'est recueilli à l'issue de l'intervention. Lorsque les ovaires ne répondent pas correctement à la stimulation, l'arrêt du traitement avant le déclenchement de l'ovulation est destiné à limiter ce risque de « ponction blanche ».

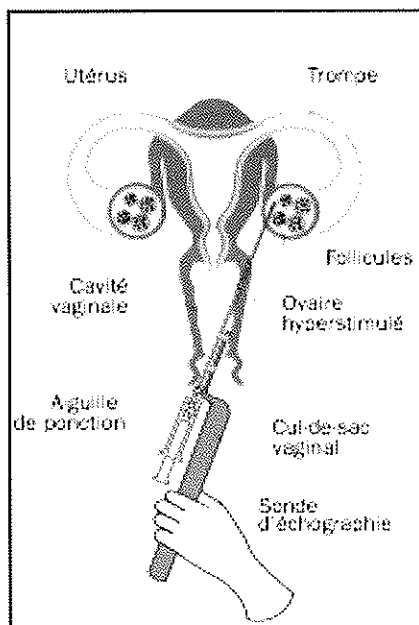


Figure 5-4. La ponction folliculaire sous échographie vaginale  
Extrait de la notice d'information de l'Agence de Biomédecine

#### 4. Le recueil et le traitement des spermatozoïdes

À l'issue du bilan réalisé avant la tentative, les caractéristiques du sperme et les données féminines ont permis de proposer au couple une prise en charge adaptée à sa situation. Qu'il s'agisse d'une FIV classique ou d'une ICSI, les spermatozoïdes du conjoint doivent être disponibles le jour de la ponction. Ce jour-là, au laboratoire, le recueil de sperme est réalisé dans les conditions identiques à celles du spermogramme. L'identité complète du patient figure sur le réceptacle contenant le sperme. Le prélèvement est ensuite placé à 37°C pour faciliter sa liquéfaction avant capacitation.

Le traitement du sperme ou capacitation *in vitro* est un élément essentiel de toute technique d'assistance médicale à la procréation et tend à mimer celle existant *in vivo* dans la glaire cervicale : élimination du plasma séminal et resuspension des spermatozoïdes dans des milieux permettant la capacitation et le maintien de la mobilité.

Les spermatozoïdes sont capités grâce à la méthode du gradient de densité (voir figure 5-5). Après une succession de lavages et de centrifugation, une fraction de spermatozoïdes mobiles est sélectionnée pour la fécondation. Il est parfois nécessaire de demander un deuxième recueil. Dans des conditions particulières, des spermatozoïdes préalablement congelés pourront être utilisés : les paillettes de congélation sont décongelées le jour de la ponction afin de récupérer des spermatozoïdes mobiles.

Avant le traitement du sperme, une lame pour le spermocytogramme est réalisée afin de définir rétrospectivement le pourcentage de formes typiques présent parmi les spermatozoïdes le jour de la tentative. On réalise aussi une analyse bactériologique du sperme (spermoculture) si le volume de l'éjaculat le permet.

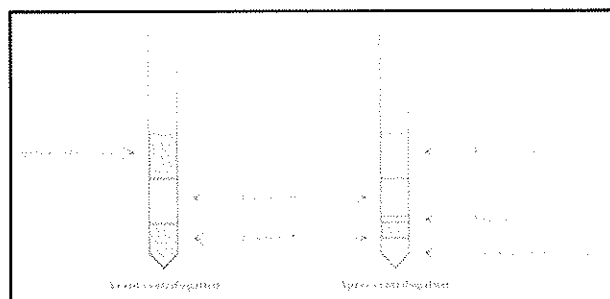


Figure 5-5. Traitement du sperme par centrifugation sur gradient de densité  
D'après l'AMP en pratique édition Masson J. Lansac et F. Guérif, 2005

## 5. La mise en fécondation en FIV classique et en ICSI

Elle permet d'obtenir des embryons soit par FIV classique soit par micro-injection de spermatozoïde (ICSI). Manipuler les gamètes nécessite de l'expérience et une très grande rigueur. L'obtention de grossesse à taux régulièrement élevé exige une optimisation permanente de chaque étape du processus de l'interaction gamétique.

Le micro-environnement des gamètes doit être constant et aussi proche que possible des conditions *in vivo* :

- température à 37°C ;
- pH compris entre 7,3 et 7,6 ;
- pression osmotique des milieux de culture comprise entre 275 et 285 millimoles/kg ;
- exposition lumineuse des gamètes et zygotes réduites au maximum ;
- contrôle du mélange gazeux des incubateurs (5% de CO<sub>2</sub>) ;
- qualité des milieux de culture

Ainsi les incubateurs recevant les embryons doivent être contrôlés en température et en concentration en CO<sub>2</sub> régulièrement.

### 5-2. La fécondation *in vitro* conventionnelle ou classique

Les boîtes de culture contiennent quatre puits contenant chacun 0,5 à 1mL de milieu. Le premier puits sert au recueil des complexes cumulo-ovocytaires et à leur rinçage. Environ une heure après leur recueil, chaque ovocyte est transféré et inséminé dans un second puits (3 à 6 ovocytes par puits) avec environ 50 000 spermatozoïdes mobiles par ovocytes. Immédiatement après cette insémination, la boîte de culture est placée dans l'incubateur jusqu'au lendemain matin. À l'abri de la lumière, dans un milieu de culture adapté à leur survie, les gamètes bénéficient de conditions favorables pour réussir la fécondation.

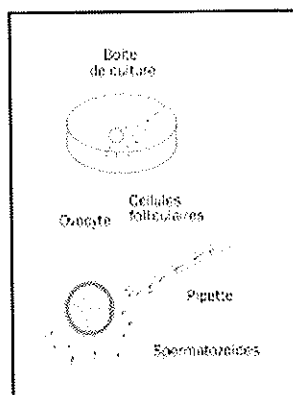


Figure 5-6. La mise en fécondation lors d'une FIV classique  
Extrait de la notice d'information de l'Agence de Biomédecine

### 5-3. La fécondation *in vitro* avec micro-injection (ICSI)

Pour réaliser une micro-injection, il est indispensable de disposer d'une part d'un microscope inversé muni d'une platine chauffante à 37°C et équipé d'un système de modulation de contraste de Hoffmann et d'autre part d'un système d'injection et d'aspiration.

- **Le système d'injection** comprend une pipette d'injection biseautée et acérée de 5 à 8 µm de diamètre externe et un dispositif extrêmement fin d'aspiration et de refoulement du spermatozoïde.
- **Le système d'aspiration** comprend une pipette de maintien ou contention de 40 à 60 µm de diamètre et un dispositif extrêmement fin d'aspiration et de refoulement de l'ovocyte. Les pipettes de micro-injection et de contention présentent le plus souvent une angulation de 20 à 30 degré.

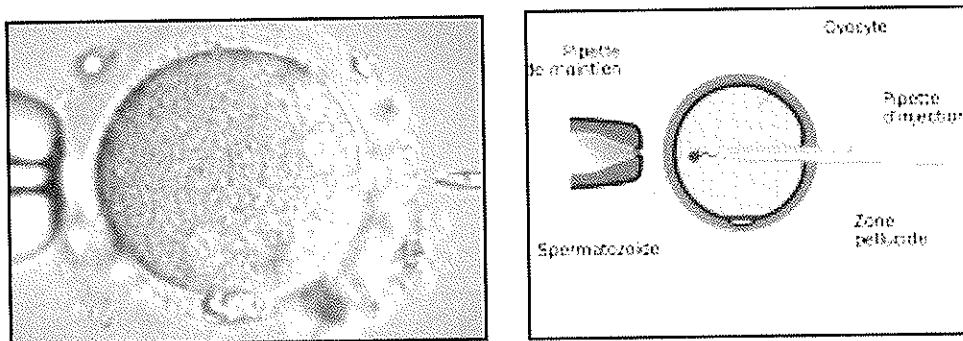


Figure 5-7. Schéma de la micro-injection

Extrait de la notice d'information de l'Agence de Biomédecine

- **Avant la réalisation de l'ICSI, il faut procéder à plusieurs étapes :**
  - Préparation des ovocytes : élimination des cellules du cumulus et de la corona radiata qui peuvent d'une part obstruer la pipette de contention, et d'autre part sont un obstacle physique à la visualisation du premier globule polaire permettant ainsi d'apprécier la maturité nucléaire de l'ovocyte à injecter. Cette décoronisation est réalisée en associant une action mécanique et enzymatique brève (hyaluronidase). L'absence de globule polaire voire la présence d'une vésicule germinative témoigne de l'immaturité nucléaire de l'ovocyte et l'exclut donc de la micro-injection.
  - Préparation de la boîte de micro-injection : L'ICSI se déroule dans une petite boîte de Pétri comprenant une goutte centrale de quelques µL de PVP (polyvinylpyrrolidone) destinée à recevoir un aliquot de la suspension de spermatozoïdes préparés, des gouttes latérales de milieu de culture tamponné destinées à recevoir isolément chaque ovocyte.

Toutes ces gouttes sont recouvertes par de l'huile minérale préalablement équilibrée à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

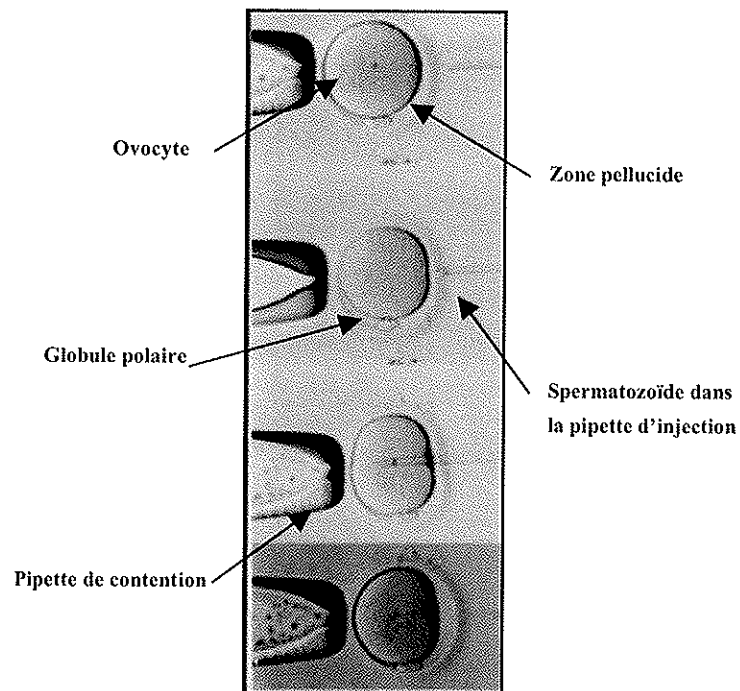


Figure 5-8. Les étapes de l'injection du spermatozoïde dans l'ovocyte lors de l'ICSI.

D'après l'AMP en pratique édition Masson J. Lansac et F. Guérif, 2005

● **Les principales étapes du geste de micro-injection sont les suivantes :**

- Immobilisation du spermatozoïde : elle est facilitée par le PVP qui ralentit la progression du spermatozoïde. Un spermatozoïde mobile et de morphologie normale est immobilisé, grâce à la micropipette d'injection, par un geste de cisaillement du flagelle en arrière de la pièce intermédiaire. Après immobilisation, le spermatozoïde est aspiré dans la micropipette par l'extrémité de son flagelle.
- Positionnement de l'ovocyte : l'ovocyte présent dans une goutte de milieu de culture est positionné de telle manière à placer le premier globule polaire à 6 ou 12 heures. Une aspiration délicate permet de maintenir fermement l'ovocyte.
- Injection du spermatozoïde dans l'ovocyte : La pipette de micro-injection est positionnée à 3 heures, au contact de l'ovocyte et dans le même plan. Le spermatozoïde est rapproché de l'extrémité de la pipette d'injection. L'avancée de la micropipette permet de traverser la zone pellucide et de déformer vers le centre la membrane plasmique dont la rupture est visualisée par une aspiration du cytoplasme. Le cytoplasme aspiré et le spermatozoïde sont alors délicatement replacés au centre de l'ovocyte avant le retrait de la micropipette et la libération de l'ovocyte. À la fin de

l'ICSI, les ovocytes sont rincés et placés en puits dans une boîte de culture, mis en incubateur jusqu'à l'observation 15 à 20 heures plus tard.

## 6. La culture *in vitro* des embryons et l'observation des embryons

La culture *in vitro* des ovocytes se déroule sur deux ou trois jours pour les délais classiques ou sur 6 jours pour les cultures prolongées en milieu séquentiel jusqu'au stade de blastocyste (figure 5-9).

Concernant la surveillance des différentes étapes de culture (ovocyte, zygote, embryon), il vaut mieux éviter de les sortir trop souvent pour les examiner afin d'éviter les chocs thermiques préjudiciables au développement cellulaire.

À J1, les *pronuclei* apparaissent entre 5 et 20 heures après l'insémination. C'est entre 15 et 20 heures qu'ils seront examinés. Si deux *pronuclei* sont visibles, l'ovocyte est considéré comme normalement fécondé et le zygote est typé selon la classification des Z (voir étape **A** plus bas).

Il est noté aussi à cette étape :

- Le nombre d'ovocytes non fécondés, leur morphologie;
- Le nombre de fécondations anormales (polyspermie);
- Dans le cas des FIV, la fixation des spermatozoïdes sur la zone pellucide et le pourcentage de spermatozoïdes survivants dans le puits de culture.

Les ovocytes fécondés en FIV classique sont ensuite incubés dans des milieux neufs (exempts de produits de dégradation du sperme) et cultivés individuellement jusqu'au moment de leur transfert ou de leur congélation.

Entre 25 et 26 heures après la mise en fécondation, les zygotes sont examinés à la recherche d'un clivage précoce (voir étape **B**).

À J2 et J3, les embryons sont typés en fonction de la régularité des blastomères, leur nombre, la présence de blastomères multinucléés. La présence de fragments cytoplasmiques et son degré d'importance par rapport au volume embryonnaire (voir étape **C**).



Enfin, à J5 et/ou J6 les blastocystes sont typés selon la classification de Gardner et Schoolcraft (1999).

Les étapes de la culture in vitro sont résumées sur la figure 5-9 ci-dessous.

Certaines étapes d'évaluation de la qualité du zygote et de l'embryon sont détaillées en **ABC**.

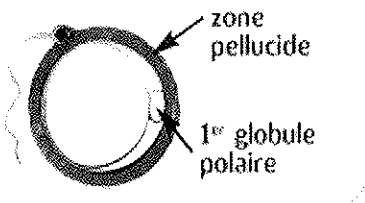
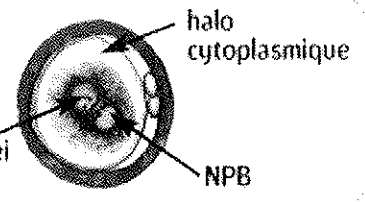

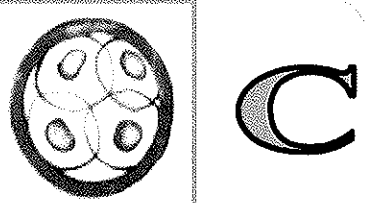
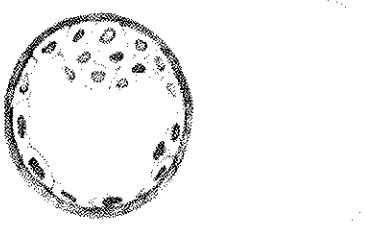
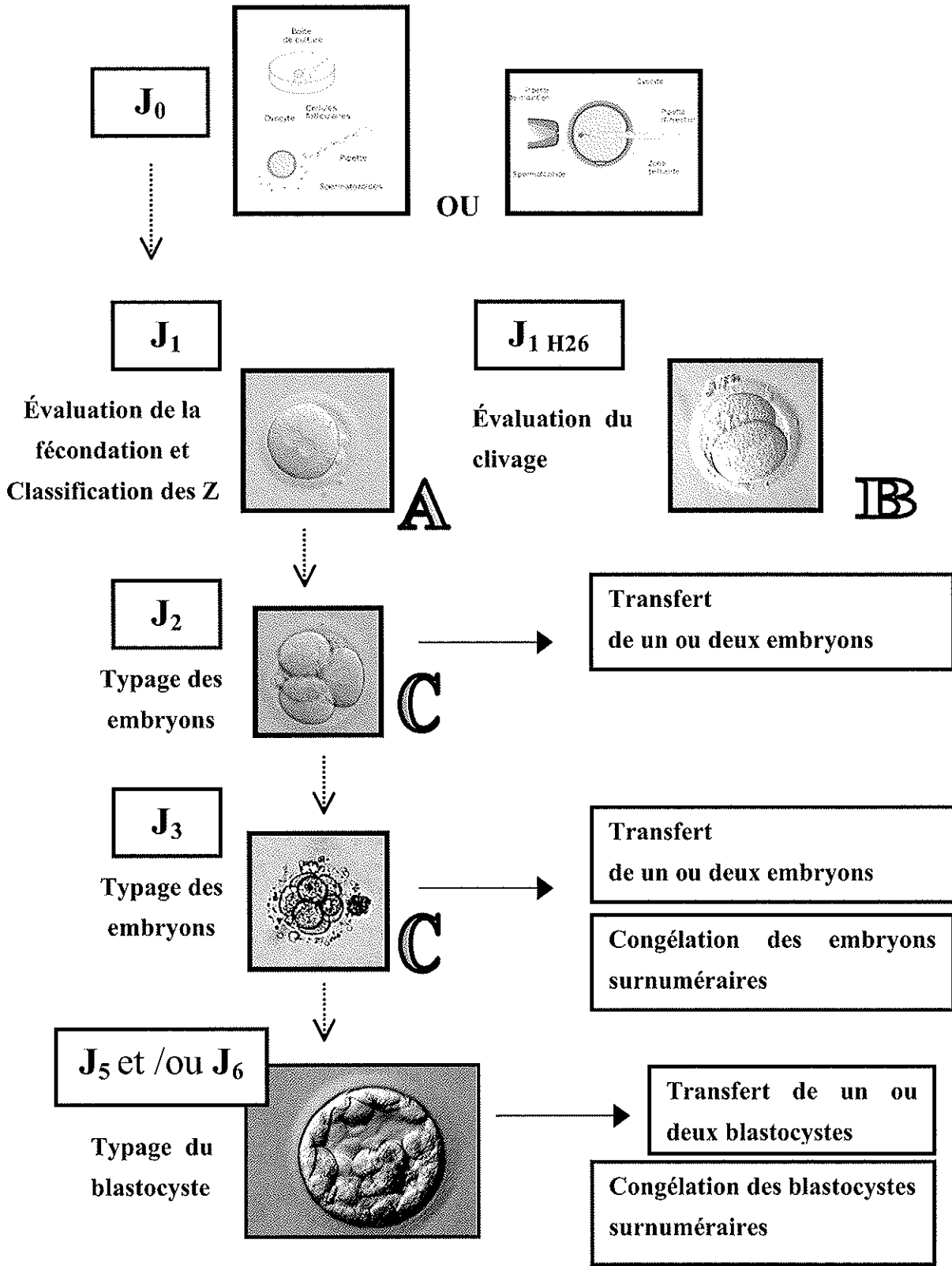
<p><b>FIV ou ICSI</b></p>	 <p>zone pellucide 1<sup>er</sup> globule polaire</p>	
<p><b>Morphologie du zygote 16-18h après FIV/ICSI :</b> Nombre et distribution des corpuscules nucléolaires précurseurs (NPB), présence d'un halo cytoplasmique</p>	 <p>halo cytoplasmique pronuclei NPB</p>	<p><b>A</b></p>
<p><b>Clivage précoce du zygote 25-27h après FIV/ICSI</b></p>		<p><b>B</b></p>
<p><b>Qualité embryonnaire à J2 - J3 :</b> Nombre de blastomères et morphologie de l'embryon (fragmentation, forme des blastomères, multinucléation)</p>		<p><b>C</b></p>
<p><b>Stade blastocyste :</b> Taille du bouton embryonnaire Cohésion du trophoctoderme</p>		

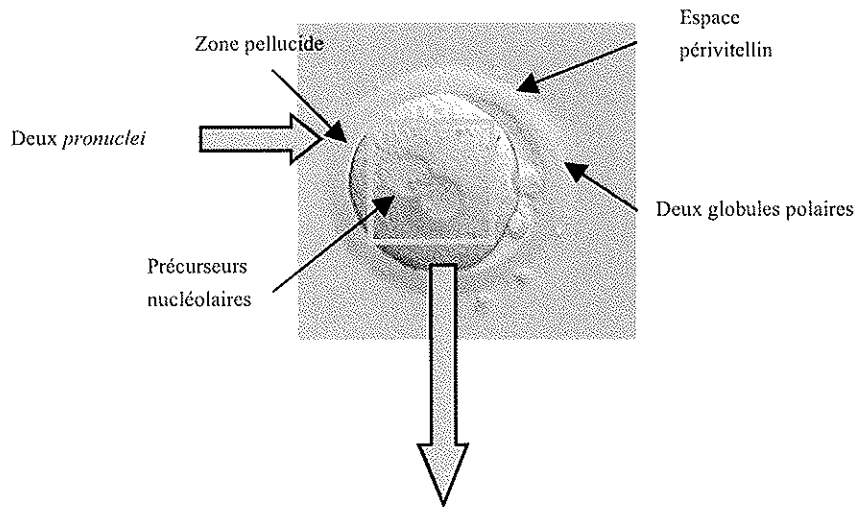
Figure 5-9. La culture in vitro des embryons : périodes d'évaluation de la qualité du zygote, de l'embryon, et du blastocyste



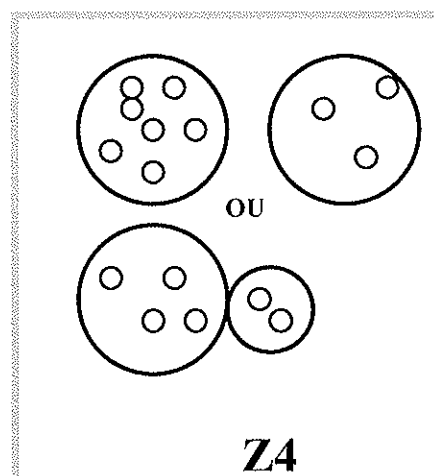
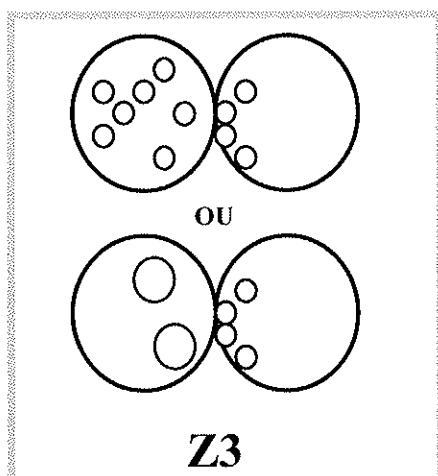
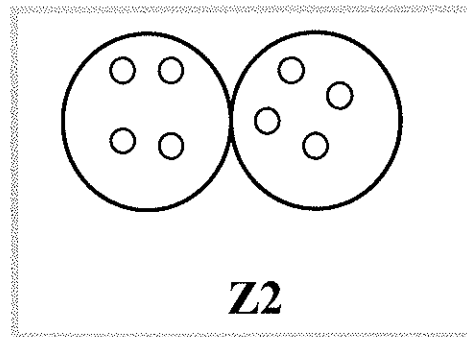
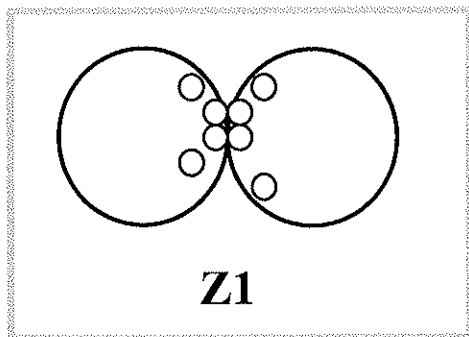


## CLASSIFICATION DES Z

C'est la classification des corpuscules précurseurs des nucléoles (ou NPB pour nucleolar precursor body) selon leur position dans chaque *pronuclei* (Scott *et al.*, 2000).



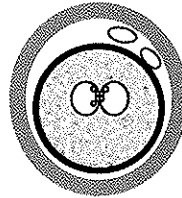
**Classification selon le nombre, la taille des précurseurs nucléolaires et leur alignement au pôle de chaque *pronucleus*.**



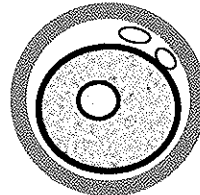
## ÉVALUATION DU CLIVAGE PRÉCOCE À LA 26<sup>ÈME</sup> HEURE

Entre 25 et 26 heures après la mise en fécondation, les zygotes sont examinés et leur stade de développement est déterminé (2 PN, 1 PN, puis syngamie et première division mitotique).

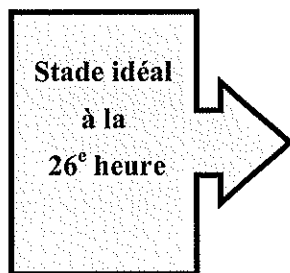
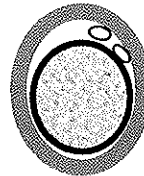
ZYGOTE À  
2PN



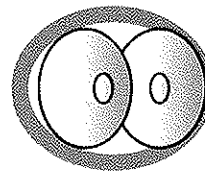
ZYGOTE À  
1 PN



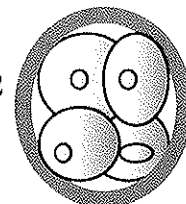
ZYGOTE À 0 PN

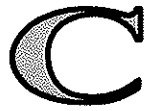


EMBRYON À 2  
BLASTOMÈRES



EMBRYON À PLUS DE 2  
BLASTOMÈRES





## QUALITÉ EMBRYONNAIRE À J2-J3

Dans notre laboratoire, le typage des embryons à J2 et J3 associe plusieurs critères :

- Le nombre de blastomères ;
- La régularité de la taille des blastomères ;
- La présence ou non de fragments cytoplasmiques et le pourcentage de ces défauts par rapport au volume de l'embryon.

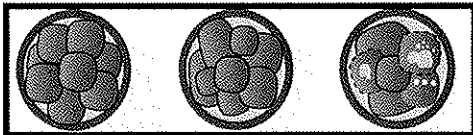
On précise aussi la présence de blastomères multinucléés. Ainsi, l'embryon sera de :

- **TYPE I : Blastomères réguliers sans présence de fragments**
- **TYPE II : Blastomères réguliers avec présence de fragments**
- **TYPE III : Blastomères irréguliers sans présence de fragments**
- **TYPE IV : Blastomères irréguliers avec présence de fragments**
- **TYPE V : Présence uniquement de fragments**

Le pourcentage de fragments cytoplasmiques est indiqué par un nombre de croix :

- **pas de croix : pas de fragments**
- **+** : moins de 20% de fragments
- **++** : de 20 à 50% de fragments
- **+++** : plus de 50% de fragments

La Taille des blastomères



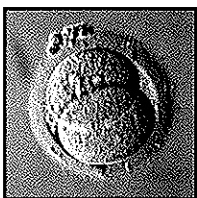
Taille égale    Taille inégale    Défects cytoplasmiques

La fragmentation cytoplasmique

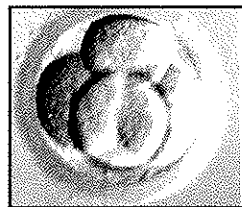


0%    <20%    20-50%    >50%

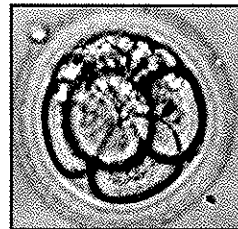
Quelques exemples de typage embryonnaire (le nombre indique le nombre de blastomères):



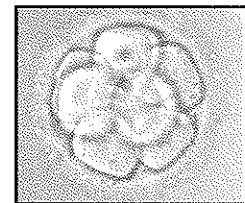
12



14



11 4+



18

## 7. Le transfert embryonnaire

### 7-1. Le geste médical

Le transfert est un geste médical, le plus souvent réalisé sous échographie et sans anesthésie. La femme est installée en position gynécologique et le gynécologue introduit délicatement à travers le col de l'utérus un cathéter fin et souple contenant les embryons en suspension dans une goutte de milieu de culture. Une petite pression sur la seringue reliée au cathéter fait glisser doucement les embryons dans la cavité utérine. Bien qu'aucune étude n'ait pu évaluer de façon satisfaisante le bénéfice d'un repos après le transfert, de nombreuses équipes proposent aux patientes de rester allongées pendant quinze minutes à deux heures selon les centres.

Ce geste est simple et indolore grâce au test de transfert réalisé au cours de l'hystérocopie au cours d'un cycle précédant la FIV. Ce test est important car il permet de choisir le cathéter le plus adapté à la morphologie utérine et à l'orientation du col utérin afin d'éviter les douleurs et les contractions utérines lors du transfert. Il peut arriver qu'un changement de cathéter soit nécessaire au cours du transfert.

Enfin, dans certains cas où le test de transfert a montré un passage transcervical difficile du cathéter, le recours à l'anesthésie générale peut être l'ultime solution pour permettre un transfert indolore.

Une supplémentation de la phase lutéale est démarrée 48 heures après la ponction par de la progestérone naturelle administrée par voie vaginale.

Le transfert des embryons peut avoir lieu à J2 ou J3, et dans certains cas, à J5 ou J6 (culture prolongée).

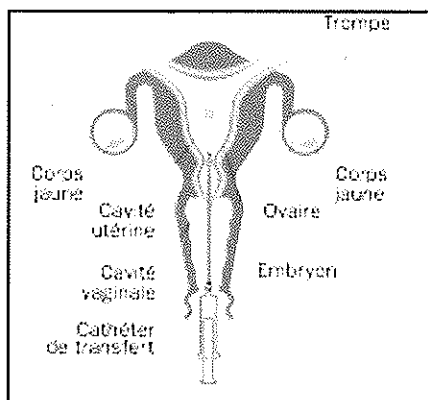


Figure 5-10. Le transfert embryonnaire

Extrait de la notice d'information de l'Agence de Biomédecine

## **7-2. Le nombre d'embryons à transférer**

### **7-2-A. Le choix du nombre d'embryons à transférer**

Ce choix se fera majoritairement à J2 ou J3 en fonction de la cinétique d'évolution, du statut utérin, de l'âge de la femme et du désir du couple. Celui-ci aura été préalablement informé en consultation par le biologiste des résultats et des risques de grossesses multiples en fonction du nombre et de la qualité des embryons transférés.

### **7-2-B. Vers le transfert d'embryon unique**

Le traitement par FIV est associé à une incidence élevée de grossesses multiples. C'est ainsi qu'en 1999, en Europe, le taux de grossesses multiples était de 26.3% avec une majorité de jumeaux (Nygren *et al.*, 2002). Aujourd'hui en France, il est supérieur à 20% (ABM 2006). Les grossesses multiples constituent un problème en AMP car elles accroissent les risques médicaux pour la mère et les enfants à naître. C'est pourquoi une nouvelle politique de transfert est apparue : le transfert d'embryon unique (Coetsier *et al.*, 1998). Cette stratégie de transfert est débattue car il est admis que le nombre d'embryons transférés est étroitement lié au taux de succès. Cependant il a été montré qu'un taux acceptable de grossesse peut être atteint si un embryon de « top qualité » est disponible pour le transfert (Vilksa *et al.*, 1999). Un embryon est dit « top » si à J2 il a 4 blastomères non multinucléés avec moins de 20% de fragments. À la fin des années 1990, plusieurs articles décrivant l'efficacité d'un transfert embryonnaire unique (single embryo transfer ou SET) dans certaines conditions ont ouvert une voie nouvelle dans la stratégie de transfert embryonnaire (Gerris *et al.*, 1999). Ces résultats encourageants ( $\geq 35\%$  de grossesses cliniques par transfert) ont été confirmés par d'autres études au début des années 2000 (De Neubourg *et al.*, 2002 ; Gerris *et al.*, 2002 ; de Sutter *et al.*, 2003 ; Tiitinen *et al.*, 2003 ; Thurin A. *et al.*, 2004). À partir de ces études, plusieurs pays ont établi des recommandations, voire des obligations dans le nombre d'embryons à transférer. En France, il n'y a pas de législation mais des recommandations. Cela s'oppose aux stratégies nord-américaines qui prônent le transfert de plus de trois embryons. Ainsi des taux de grossesse élevés sont atteints mais avec un nombre non négligeable de réductions embryonnaires.

## **8. La cryoconservation des embryons surnuméraires**

La possibilité de congeler à été proposée dès 1983. Il fut alors démontré que les embryons conservés dans l'azote liquide (-196°C) conservait un potentiel évolutif. Cependant, tous les embryons ne survivent pas à la congélation/décongélation : 25 à 40% d'entre eux ne résistent pas. Mais la congélation apporte une alternative à la destruction des embryons surnuméraires et permet des transferts d'embryons supplémentaires (avec un protocole de stimulation moins lourd). Ainsi, avec accord préalable des patients, et sous réserve que l'embryon réponde aux critères morphologiques de conservation, la cryoconservation des embryons est possible. Cette congélation peut se faire à différents stades de la culture embryonnaire (J3, J5 ou J6).



## **PARTIE 3 : Étude statistique**

# CHAPITRE 6. L'ANALYSE DESCRIPTIVE

## 1. INTRODUCTION

Les chances de grossesses sont corrélées au nombre d'embryons transférés et à la qualité embryonnaire. Afin de choisir les embryons avec le meilleur potentiel implantatoire, il faut connaître les facteurs prédictifs du taux de grossesses et du taux d'accouchements.

Plusieurs facteurs ont déjà été décrits : l'évaluation du grade de l'embryon selon le pourcentage de fragmentation cytoplasmique, la régularité de la taille des blastomères, le nombre de blastomères (Van Royen *et al.*, 1999 ; Hardarson *et al.*, 2001 ; De Neubourg *et al.*, 2004). La qualité de l'embryon a aussi été corrélée à la morphologie des précurseurs nucléolaires au stade de zygote (Scott and Smith, 1998). De plus, un clivage précoce semble lié à un taux de grossesse plus élevé (Sakkas *et al.*, 1998 ; Lundin *et al.*, 2001 ; Sakkas *et al.*, 2001 ; Fenwick *et al.*, 2002 ; Salumets *et al.*, 2003 ; Van Montfoort *et al.*, 2004). D'autres variables sont connues pour influencer le taux de grossesse comme l'âge de la femme (Tampleton *et al.*, 1996 ; Thurin *et al.*, 2005). Une large étude rétrospective en Scandinavie a déjà mis en évidence plusieurs facteurs prédictifs au sein d'une même étude par analyse univariée puis multivariée pour prouver l'indépendance de ces facteurs entre eux (Thurin *et al.*, 2005).

Le but de notre travail est une large analyse rétrospective de l'activité du centre d'AMP du CHU de Limoges afin de mettre en évidence des variables liées au couple et/ou à l'embryon, susceptibles d'être prédictives de l'implantation et de l'accouchement. Cette étude se divise en deux parties : l'analyse purement descriptive et la comparaison des données du centre selon la technique et par rapport aux données nationales pendant la même période, puis, la mise en évidence de variables indépendantes susceptibles d'expliquer les taux de grossesses et d'accouchements.

## 2. MATERIELS ET METHODE

### 2-1. Schéma d'étude

Il s'agit d'une étude de cohorte rétrospective. Elle rassemble l'ensemble des tentatives réalisées en FIV classique et en FIV avec ICSI de 2003 à 2006 au laboratoire d'AMP du Centre Hospitalo-Universitaire de Limoges.

## 2-2. Population étudiée

L'ensemble des tentatives (n=1260) comprend les FIV classiques (n=785) et les FIV avec ICSI (n=475) qu'il y ait eu ou non un transfert d'embryons lors de la tentative. L'analyse rétrospective s'est faite de façon bien distincte : analyse des données en FIV classique d'une part, et analyse des données en FIV avec ICSI d'autre part. Les données ont été recueillies en respectant l'anonymat des couples.

Les critères de non inclusion dans l'étude étaient les tentatives avec sperme de donneur, avec spermatozoïdes préalablement congelés, recueillis dans les urines ou prélevés chirurgicalement (au niveau épидидymaires et testiculaire). Les transferts d'embryons congelés n'ont pas non plus été étudiés.

Tableau 6-1. Caractéristiques des tentatives en FIV classique et avec ICSI de 2003 à 2006

	FIV classique	FIV avec ICSI
<b>Nombre de tentatives ou ponctions</b>	<b>785</b>	<b>475</b>
<i>Age moyen de la femme</i>	<i>33,6±4,4</i>	<i>33±4,5</i>
<i>Age moyen de l'homme</i>	<i>35,7±5,7</i>	<i>35,4±5,6</i>
Nombre total de ponctions blanches	7	0
<b>Nombre total de ponctions</b>		
• Sans ovocyte mûr	7	3
• Sans ovocyte fécondé	131	68
• Avec ovocyte fécondé	640	407
• Avec embryon	626	331
• Avec blastocyste	187	86
• Avec congélation de blastocystes	110	33
• Avec congélation à J2 ou J3	61	47
<b>Ovocytes</b>		
Recueillis	6336	4257
Inséminés en FIV classique ou Injectés en ICSI	6220	2829
<i>Ovocytes recueillis/ponction</i>	<i>8</i>	<i>8,9</i>
<i>% ovocytes inséminés ou injectés/recueillis</i>	<i>98%</i>	<i>66%</i>
<b>Embryons</b>		
Obtenus	2502	1441
Transférés	1100	731
Congelés	372	202
<i>% embryons obtenus/ovocytes inséminés</i>	<i>40%</i>	<i>51%</i>
<i>% embryons congelés/embryons obtenus</i>	<i>14%</i>	<i>14%</i>
<i>% embryons transférés ou congelés/embryons obtenus</i>	<i>59%</i>	<i>65%</i>
<b>Nombre de transferts</b>	<b>611</b>	<b>397</b>
<i>% de transferts par ponction</i>	<i>77,8%</i>	<i>83,6%</i>
<i>Nombre moyen d'embryons transférés</i>	<i>1,8±0,5</i>	<i>1,8±0,5</i>
<b>Nombre de grossesses biochimiques</b>	<b>207</b>	<b>137</b>
<i>% par ponction</i>	<i>26,3%</i>	<i>28,8%</i>
<i>% par transfert</i>	<i>33,3%</i>	<i>34,5%</i>
<b>Nombre de grossesses échographiques</b>	<b>196</b>	<b>118</b>
<i>% par ponction</i>	<i>24,9%</i>	<i>24,8%</i>
<i>% par transfert</i>	<i>32,0%</i>	<i>29,7%</i>
<b>Nombre de grossesses évolutives</b>	<b>167</b>	<b>110</b>
<i>% par ponction</i>	<i>21,2%</i>	<i>23,1%</i>
<i>% par transfert</i>	<i>27,3%</i>	<i>27,7%</i>
<b>Nombre d'accouchements</b>	<b>163</b>	<b>108</b>
<i>% par ponction</i>	<i>20,7%</i>	<i>22,0%</i>
<i>% par transfert</i>	<i>26,6%</i>	<i>27,2%</i>
Nombre d'accouchements uniques	123	83
Nombre d'accouchements gémellaires	40	25
Nombre de fausses couches 1 <sup>er</sup> trimestre	11	5
Nombre de fausses couches 2 <sup>e</sup> trimestre	3	2
Nombre de grossesses extra-utérines	6	3

## 2-3. Le déroulement d'une tentative

### 2-3-A. La stimulation ovarienne

La patiente a débuté son traitement hormonal au début de son cycle selon le protocole choisi préalablement :

- **protocole long**

L'agoniste de la GnRH (*Décapeptyl 3<sup>®</sup>*, *Beaufour-Ipsen*, Boulogne, France) a été prescrit en injection intra-musculaire une fois par jour à partir du premier jour des règles. La FSH recombinante (*Gonal F<sup>®</sup>*, *Merck Serono*, Lyon, France ou *Puregon<sup>®</sup>*, *Schering Organon*, Puteaux, France) en injection sous-cutanée une fois par jour a été ensuite débutée à J13 sous condition d'un contrôle échographique correct. À partir de J20, le traitement a été adapté aux résultats de la surveillance échographique et du dosage du taux de 17 $\beta$  estradiol.

- **protocole court**

L'agoniste de la GnRH (*Décapeptyl 0,1<sup>®</sup>*, *Beaufour-Ipsen*, Boulogne, France) en injection intra-musculaire et la FSH recombinante (*Gonal F<sup>®</sup>*, *Merck Serono*, Lyon, France ou *Puregon<sup>®</sup>*, *Schering Organon*, Puteaux, France) en injection sous-cutanée une fois par jour a été prescrite à partir du premier jour des règles jusqu'au déclenchement. À partir de J4, le traitement a été adapté aux résultats de la surveillance échographique et du dosage de l'estradiolémie.

- **protocole Cétrotide**

L'antagoniste de la GnRH (*Cétrotide<sup>®</sup>*, *Merck Serono*, Lyon, France) a été prescrit en injection sous-cutanée une fois par jour à partir de J6 jusqu'au jour du déclenchement. L'injection de FSH recombinante (*Gonal F<sup>®</sup>*, *Merck Serono*, Lyon, France ou *Puregon<sup>®</sup>*, *Schering Organon*, Puteaux, France) une fois par jour a été prescrite de J2 à J5, puis poursuivie jusqu'au déclenchement.

### 2-3-B. Le déclenchement de l'ovulation

La décision de déclenchement a été prise lorsque au moins deux follicules avaient atteint un diamètre de 15 à 20 mm (avec la FSH recombinante) ou de 20 à 25mm (avec l'HMG). L'autre condition était que le taux de 17 $\beta$  estradiol soit cohérent avec l'ensemble des images folliculaires (sécrétion d'estradiol par follicule de plus de 14 mm entre 200 et 250 pg/ml avec l'HMG et entre 150 et 200 pg/ml avec la FSH recombinante). Les patientes ont été déclenchées par une injection sous-cutanée de 0,5 mg d'HCG recombinante (*Ovitrelle<sup>®</sup>*, *Merck Serono*, Lyon, France) 35 heures avant la ponction.

Notons que lors des stimulations ovariennes, certains collaborateurs ont parfois utilisé de l'HMG, *Menopur*<sup>®</sup> (Ferring, Saint-Prex, Suisse). De plus, en cas d'intolérance ou d'allergie médicamenteuse au *Décapeptyl*<sup>®</sup>, un autre agoniste de la GnRH a été prescrit (*Enantone*<sup>®</sup>, Takeda, Puteaux, France). De même, un antagoniste de la GnRH alternatif au *Cétrotide*<sup>®</sup> a été prescrit (*Orgalutran*<sup>®</sup>, Schering Organon, Puteaux, France). Enfin, dans de très rares cas, au lieu de l'HCG recombinante *Ovitrelle*<sup>®</sup>, il a été utilisé de l'HCG urinaire (*Gonadochorionique endo*<sup>®</sup>, Schering Organon, Puteaux, France).

### 2-3-C. La FIV classique et la FIV avec ICSI

- **La ponction folliculaire** a été réalisée par le gynécologue au bloc opératoire sous sédation puis transmise au biologiste. Chaque tube prélevé a été examiné sous loupe binoculaire et les complexes cumulo-ovocytaires ont été triés et nettoyés dans un milieu de rinçage. Les ovocytes ont été comptés et mis en incubateur en vue de la FIV classique ou de la FIV avec ICSI.

- **Le recueil de sperme** a eu lieu au centre d'AMP le même jour que la ponction. Le sperme a été capacité par méthode du gradient de densité. Dans le cas d'une FIV conventionnelle, 50 000 spermatozoïdes progressifs mobiles (a+b) par ovocyte étaient nécessaires. Alors que pour les ICSI, la quantité de sperme déposée dans la boîte de micro-injection était de l'ordre de 1000 spermatozoïdes (à adapter selon la mobilité et au degré de tératozoospermie).

- **La FIV conventionnelle**

Les spermatozoïdes capités ont été simplement mis au contact des ovocytes dans une boîte de culture contenant un 0,5 à 1 mL de milieu nutritif et placés à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans un incubateur jusqu'au lendemain où les ovocytes fécondés ont été évalués et changés de bain. Sur un certain nombre de tentatives, ce changement de bain a eu lieu seulement trois heures après l'insémination.

- **La FIV avec micro-injection**

Les cellules du cumulus ont été décoronisées par action mécanique et enzymatique (*Hyaluronidase*<sup>®</sup>, *Fertipro*, Beernem, Belgique). La visualisation du premier globule polaire permettant d'apprécier la maturité nucléaire, seuls les ovocytes en métaphase II ont été injectés. La boîte de micro-injection a ensuite été préparée avec du polyvinylpyrrolidone (*PVP*<sup>®</sup>, *Fertipro*, Beernem, Belgique), du milieu tamponné (*Ferticult Flushing*<sup>®</sup>, *Fertipro*, Beernem, Belgique), le tout recouvert d'huile minérale. L'injection a été pratiquée sous microscope avec contraste d'*Hoffmann* avec un appareil de micromanipulation *Eppendorf*<sup>®</sup> (*Leica microsystem*, Reuilmalmaison, France), une micropipette d'injection (*ICSI Micropipets*<sup>®</sup>, *Humagen*, Charlottesville, US) et une micropipette de contention (*Holding Micropipets*<sup>®</sup>, *Humagen*, Charlottesville, US). Les ovocytes une fois injectés, ont été placés

en boîtes de culture dans un milieu liquide nutritif et mis en incubateur jusqu'au lendemain comme dans une FIV conventionnelle.

#### • La culture *in vitro* des embryons et l'observation des embryons

La culture *in vitro* s'est déroulée sur deux ou trois jours pour les délais classiques ou sur 6 jours pour les cultures prolongées en milieu séquentiel jusqu'au stade de blastocyste (CCM30<sup>®</sup>, Vitrolife, Göteborg, Suède). La qualité du zygote a été évaluée selon la classification des « Z » quinze à vingt heures après la mise en fécondation, puis une nouvelle évaluation a eu lieu à la 26<sup>e</sup> heure. Au deuxième et troisième jour, les embryons ont été typés jusqu'au cinquième et sixième jour.

Les embryons surnuméraires ont été congelés lorsqu'ils répondaient aux critères de cryoconservation.

#### 2-3-D. Le transfert embryonnaire

Le transfert des embryons a eu lieu à J2 ou J3, et dans certains cas, à J5 ou J6 (culture prolongée). Une supplémentation de la phase lutéale a été démarrée le jour du transfert avec de la progestérone naturelle administrée par voie vaginale (Estima<sup>®</sup>, Effick, Bièvres, France). Le transfert a été réalisé au centre d'AMP par le gynécologue agréé avec des cathéters de différents types : cathéter simple (Frydman Classic cathéter 4,5<sup>®</sup>, CCD, Paris, France), cathéter double lumière de Frydman (Frydman Soft 4,5 with guide<sup>®</sup>, CCD, Paris, France) ou cathéter difficile (Frydman Memory cathéter 4,5<sup>®</sup>, CCD, Paris, France). Le test de transfert réalisé avant la tentative a permis de prévoir le cathéter le plus approprié même si un changement de cathéter a été parfois nécessaire au cours d'un transfert. Les patientes ont bénéficié d'un repos d'une heure ou deux après le transfert.

#### 2-3-E. L'issue de la tentative

Le dosage plasmatique des  $\beta$ -HCG a été effectué quatorze jours après le transfert, et a été renouvelé à 48 heures dans le même laboratoire en cas de positivité afin de confirmer la grossesse biochimique (> 100 UI/mL). Une échographie précoce a été réalisée une dizaine de jours plus tard afin de confirmer la grossesse échographique (implantation intra-utérine, nombre de sac embryonnaire et activité cardiaque). L'issue de la tentative a été suivie jusqu'à l'accouchement.

#### 2-4. La base de donnée

La base de donnée a été constituée de manière rétrospective sur fichier Excel à partir des registres des tentatives. Ce fichier a été constitué en attribuant un numéro à chaque tentative.

Les données collectées caractérisent à la fois le couple et la tentative en elle-même. Un couple pouvait bénéficier de plusieurs tentatives.

Les variables recueillies concernaient :

- **Le couple**

- L'âge de la femme ;
- L'âge de l'homme ;
- Le type de protocole de stimulation ovarienne ;
- Les indications.

- **Les données du laboratoire**

- Le pourcentage de formes typiques de spermatozoïdes sur le spermocytogramme de la tentative ;
- Le pourcentage de spermatozoïdes survivants 17 heures après la FIV (survie) ;
- Le changement de bain 3 heures après la FIV ;
- Le nombre d'ovocytes recueillis à la ponction ;
- Le nombre d'ovocytes ayant une fracture pellucide ;
- Le nombre d'ovocytes intacts et inséminés ;
- Le nombre d'ovocytes en métaphase II ;
- Le nombre de zygotes diploïdes (2PN) ;
- Le nombre de zygotes triploïdes (3PN ou plus) ;
- Le nombre de zygotes à 1 *pronucleus* (1PN) ;
- Le nombre de zygotes sans division cellulaire ;
- Le nombre d'embryons obtenus après fécondation normale.

- **Le transfert**

- Le nombre d'embryons transférés ;
- Le jour de transfert ;
- Le médecin gynécologue ayant réalisé le transfert ;
- Le type de cathéter utilisé ;
- La qualité du transfert ;
- Le médecin biologiste ayant réalisé le transfert.

- **Pour les embryons transférés**

- Le nombre d'embryons type Z1 ou Z2 à J1 ;
- Le nombre d'embryons à 0PN à la 26<sup>e</sup> heure ;
- Le nombre d'embryons à 2 cellules à la 26<sup>e</sup> heure ;



- Le nombre d'embryons à 4 cellules régulières,  $\leq 20\%$  de fragmentation, à J2;
- Le nombre d'embryons à 8 cellules régulières,  $\leq 20\%$  de fragmentation, à J3.

- **L'issue de la tentative**

- Le transfert embryonnaire (oui ou non) ;
- Le nombre d'embryons transférés par transfert ;
- Le nombre de blastocystes obtenus après culture prolongée ;
- Le nombre d'embryons congelés à J2 ou J3 ;
- Le nombre d'embryons congelés au stade blastocyste ;
- L'obtention d'une grossesse biochimique ( $\beta$ -HCG > 100 UI) ;
- L'obtention d'une grossesse échographique ;
- L'obtention d'une grossesse évolutive (> à 12 semaines d'aménorrhée).

- **L'issue de la Grossesse**

- Grossesse extra-utérine (GEU) ;
- Fausse couche du premier trimestre ;
- Fausse couche du deuxième trimestre ;
- Interruption médicale de grossesse (IMG) ;
- Accouchement (unique, jumeaux).

- **L'issue de l'accouchement**

- Le nombre de nouveau-nés à 22 semaines d'aménorrhée et/ou pesant plus de 500 grammes à la naissance ;
- Le nombre de nouveau-nés vivants à 22 semaines d'aménorrhée ;
- Le nombre de mort-nés en dehors d'un contexte d'IMG ;
- Le nombre d'IMG à plus de 22 semaines d'aménorrhée ou fœtus de plus de 500g ;
- Le nombre de garçons ou de filles né(e)s ;
- Le nombre de malformations à la naissance ;
- Le nombre d'anomalies chromosomiques.

## 2-5. Analyses statistiques

L'analyse a d'abord été purement descriptive puis nous avons essayé de dégager des facteurs prédictifs du taux de fécondation, de grossesses et d'accouchements. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SAS (version 9.2). Les variables à prédire ou variables dépendantes sont détaillées ci-dessous. Une analyse univariante des données a d'abord été

réalisée afin de mettre en évidence les facteurs prédictifs grâce au coefficient de corrélation de Pearson ou test de  $\chi^2$  (ou test exact de Fisher en fonction des effectifs théoriques), test de Kruskal-Wallis, test de Wilcoxon, et test t de Student. À partir de ces résultats, une analyse multivariable par régression linéaire multiple ou régression logistique (en fonction du type de la variable dépendante) a été réalisée pour chaque variable dépendante afin de mettre en évidence les variables statistiquement **significatives et indépendantes**. Chaque modèle initial a inclus les variables significatives et celles dont le degré de significativité était inférieur à 0,2000. Le modèle a ensuite été simplifié en pas à pas descendant, jusqu'au modèle final. Pour la régression logistique, des odds ratio ont été estimés ainsi que leurs intervalles de confiance à 95% par méthode exacte. Le seuil de significativité retenu pour l'ensemble des analyses est de 0,0500.

### **2-5-A. Les variables dépendantes**

Ce sont les variables que nous avons cherché à expliquer statistiquement grâce aux données recueillies en FIV classique et en ICSI :

- **Le taux de fécondation** : rapport du nombre de zygotes normaux sur le nombre d'ovocytes en métaphase II ;
- **La grossesse biochimique** ;
- **L'accouchement** (unique, jumeaux).

### **2-5-B. Les variables indépendantes**

Parmi toutes les variables répertoriées, voici celles retenues comme potentiellement explicatives du taux de fécondation, de la grossesse biochimique, et de l'accouchement. Il existe quelques différences selon la technique d'AMP utilisée.

#### **2-5-B-a. En FIV classique**

- **Le taux de fécondation pourrait être lié statistiquement** :
  - À l'âge de la femme ;
  - À l'âge de l'homme ;
  - Au type de stimulation ovarienne;
  - Aux indications de la technique ;
  - Au pourcentage de formes typiques de spermatozoïdes sur le spermocytogramme de la tentative ;
  - Au pourcentage de spermatozoïdes survivants 17 heures après la FIV ;

- Au résultat de la spermoculture ;
  - Au changement de bain 3 heures après la FIV ou après 20 heures ;
  - Au nombre d'ovocytes intacts et inséminés ;
  - Au nombre d'ovocytes en métaphase II lors de l'insémination.
- **La grossesse biochimique et l'accouchement pourraient être expliqués statistiquement par :**
- L'âge de la femme ;
  - Le taux de fécondation ;
  - Le nombre d'embryons transférés ;
  - Le jour de transfert ;
  - Le nombre d'embryons de type Z1 ou Z2 ;
  - Le nombre d'embryons à OPN à la 26<sup>e</sup> heure ;
  - Le nombre d'embryons à 2 cellules à la 26<sup>e</sup> heure ;
  - Le nombre d'embryons à 4 cellules régulières, ≤ 20% de fragmentation, à J2.

#### 2-5-B-b. En FIV avec ICSI

- **Le taux de fécondation pourrait être lié statistiquement :**
- À l'âge de la femme ;
  - À l'âge de l'homme ;
  - Au type de stimulation ovarienne ;
  - À l'indication de l'ICSI ;
  - Au pourcentage de formes typiques de spermatozoïdes sur le spermocytogramme de la tentative d'ICSI ;
  - Au résultat de la spermoculture ;
  - Au nombre d'ovocytes matures micro injectés.
- **La grossesse biochimique et l'accouchement pourraient être expliqués statistiquement par :**
- L'âge de la femme ;
  - Le taux de fécondation ;
  - Le nombre d'embryons transférés ;
  - Le jour de transfert ;
  - Le nombre d'embryons de type Z1 ou Z2 ;
  - Le nombre d'embryons à OPN à la 26<sup>e</sup> heure ;

- Le nombre d'embryons à 2 cellules à la 26<sup>e</sup> heure ;
- Le nombre d'embryons à 4 cellules régulières, ≤ 20% de fragmentation, à J2.

### 3. RÉSULTATS

#### 3-1. Analyse descriptive

##### 3-1-A. Le couple

Tableau 6-2. FIV classique et avec ICSI : âge des patients, indications

Paramètres descriptifs	FIV classique		FIV avec ICSI	
Nombre de tentatives	785		475	
Age moyen de la femme	33,6±4,4		33,0±4,5	
Age moyen de l'homme	35,7±5,7		35,4±5,6	
<b>Type de protocole</b>				
Protocole long	381 (48,5%)		263 (55,4%)	
Antagoniste	200 (25,5%)		87 (18,3%)	
Protocole court	199 (25,4%)		124 (26,1%)	
Autre	5 (0,6%)		1 (0,2%)	
<b>Indications</b>				
	Associées	223 (28,4%)	masculine	407 (85,7%)
	Inexpliquée	135 (17,2%)		
	Masculine	156 (19,8%)	Échec PMA	68 (14,3%)
	Tubaire	57 (7,3%)		
	Autre	214 (27,3%)		

Tableau 6-3. FIV classique et avec ICSI : répartition de l'âge des femmes

Âge à la ponction	FIV classique		FIV avec ICSI	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
<30 ans	153	19,5 %	98	20,6 %
30-34 ans	290	36,9 %	187	39,4 %
35-37 ans	167	21,3 %	112	23,6 %
38-39 ans	84	10,7 %	43	9,1 %
40-42 ans	90	11,5 %	31	6,5 %
≥ 43 ans	1	0,1 %	4	0,8 %
Âge moyen	33,6 ans ±4,4		33,0 ans ±4,5	

### 3-1-B. Les données au laboratoire

Tableau 6-4. FIV classique et avec ICSI : sperme, ovocytes et embryons

Paramètres descriptifs	FIV classique	FIV avec ICSI
Pourcentage moyen de formes typiques	25±13	9,8±9,9
Pourcentage moyen de survie	48±20	-
<b>Total des Spermocultures</b>	<b>781</b>	<b>475</b>
Non effectuées	107 (14%)	105 (22%)
Négative	231 (30%)	119 (25%)
Polybactérienne	389 (49%)	228 (48%)
<i>Escherichia coli</i>	17 (2%)	11 (2%)
<i>Ureaplasma urealyticum</i> et/ou <i>Mycoplasma hominis</i>	18 (2%)	5 (1%)
<b>Ovocytes et embryons</b>		
Nombre moyen de CCO récupérés par ponction	8,0±5,5	9,9±5,6
Nombre moyen d'ovocytes avec fracture pellucide	0,1±0,5	0,6±1,3
Nombre moyen d'ovocytes intacts et inséminés ou injectés	7,9±5,4	5,9±3,9
Changement de bain à 3 heures (% par rapport au total des tentatives)	avec	99 (13%)
	sans	510 (65%)
	inconnu	171 (22%)
Nombre moyen d'ovocytes en métaphase II	6,8±4,8	5,9±3,9
Taux de fécondation*	50%±30%	50%±30%
Nombre moyen de zygotes à 2 pronuclei (2PN)	3,3±3,3	3,1±2,8
Nombre moyen de zygotes avec polyploidies (3PN ou plus)	0,4±0,8	0,3±0,7
Nombre moyen de zygotes à 1 pronucleus (1PN)	0,2±0,5	0,2±0,4
Nombre moyen de zygotes n'ayant pas eu de division cellulaire	0,1±0,3	0,1±0,3
Nombre moyen d'embryons obtenus	3,2±3,2	3±2,7

\*Taux de fécondation : rapport du nombre de zygotes normaux sur le nombre d'ovocytes en métaphase II

### 3-1-C. Le transfert

Tableau 6-5. FIV classique et avec ICSI : transferts

Paramètres descriptifs	FIV classique	FIV avec ICSI
Nombre de transferts	611	397
Nombre d'embryons transférés	1100	731
Nombre moyen d'embryons par transfert	1,8±0,5	1,8±0,5
<b>Jour de transfert</b>		
J1	-	1 (0,2%)
J2	335 (54,8%)	198 (49,9%)
J3	253 (41,4%)	197 (49,7%)
J5	20 (3,3%)	-
J6	3 (0,5%)	1 (0,2%)
<b>Type de cathéter utilisé</b>		
Double lumière	340 (55,6%)	213 (53,7%)
Cathéter simple	233 (38,2%)	157 (39,6%)
Cathéter difficile	37 (6,0%)	24 (6,0%)
Cbs	1 (0,1%)	-
Inconnu	-	3 (0,7%)
<b>Parmi les embryons transférés</b>		
Nombre moyen d'embryons type Z1 ou Z2	1,0±0,8	1,1±0,8
Nombre moyen d'embryons à 0PN	0,5±0,6	0,5±0,7
Nombre moyen d'embryons à 2 cellules	0,4±0,7	0,7±0,8
Nombre moyen d'embryons type I4, II4+	0,9±0,8	1,0±0,8
Nombre moyen d'embryons type I8, II8+	0,7±0,8	0,8±0,7

### 3-1-D. L'issue de la tentative et des grossesses

Tableau 6-6. FIV classique et avec ICSI : grossesses

Paramètres descriptifs	FIV classique	FIV avec ICSI
<b>Nombre de tentatives ou ponctions</b>	<b>785</b>	<b>475</b>
<b>Nombre de transferts</b>	<b>611</b>	<b>397</b>
<i>% de transferts par ponction</i>	77,8%	83,6%
<i>Nombre moyen d'embryons par transfert</i>	1,4±0,9	1,5±0,8
<b>Nombre de grossesses biochimiques</b>	<b>207</b>	<b>137</b>
<i>% par ponction</i>	26,3%	28,8%
<i>% par transfert</i>	33,3%	34,5%
Résultats inconnus	4	0
<b>Nombre de grossesses échographiques</b>	<b>196</b>	<b>118</b>
<i>% par ponction</i>	24,9%	24,8%
<i>% par transfert</i>	32,0%	29,7%
<b>Nombre de grossesses évolutives</b>	<b>167</b>	<b>110</b>
<i>% par ponction</i>	21,2%	23,1%
<i>% par transfert</i>	27,3%	27,7%

Tableau 6-7. FIV classique et avec ICSI : issues de grossesse et accouchements

Paramètres descriptifs	FIV classique	FIV avec ICSI
<b>Nombre d'accouchements</b>	<b>163</b>	<b>108</b>
<i>% par ponction</i>	20,7%	22,%
<i>% par transfert</i>	26,6%	27,2%
<i>% par grossesse échographique</i>	83%	91%
<b>Nombre d'accouchements uniques</b>	<b>123</b>	<b>83</b>
<i>% par accouchement</i>	75%	76%
<b>Nombre d'accouchements gémellaires</b>	<b>40</b>	<b>25</b>
<i>% par accouchement</i>	25%	24%
Nombre de fausses couches 1 <sup>er</sup> trimestre	11	5
Nombre de grossesses extra-utérines	6	3
<i>% FCS précoce et/ou GEU/grossesse échographique</i>	9%	7%
Nombre de fausses couches 2 <sup>e</sup> trimestre	3	2
<i>% FCS tardives/grossesse échographique</i>	1,5%	1,7%
<b>Issue de l'accouchement</b>		
Nombre de nouveau-nés à 22 SA et/ou > 500 g	204	133
Nombre de nouveau-nés vivants à 22 SA	203	130
Nombre de mort-nés (Hors IMG)	0	2
Nombre d'IMG	1	1
<i>% IMG/ grossesse échographique</i>	0,5%	0,8%
Sex-ratio garçon/fille	0,87	0,56
Nombre de malformations à la naissance	3	2
Nombre d'anomalies chromosomiques	0	1

SA : Semaines d'Aménorrhée ; IMG : Interruption Médicale de Grossesse à plus de 22 SA ou fœtus de plus de 500g ;  
FCS : Fausses couches spontanées ; GEU : Grossesse extra-utérine

## 3-2. Recherche de facteurs prédictifs en FIV classique

### 3-2-A.1. Le taux de fécondation en FIV classique

#### 3-2-A-a. Analyse univariée

- Il n'y a pas de corrélation entre le taux de fécondation et l'âge de la femme ( $p=0,2000$ ), l'âge de l'homme et le nombre d'ovocytes intacts et inséminés. De même, aucun résultat de spermoculture ne montre de corrélation ( $p=0,7000$ ).
- Il existe une corrélation à la limite de la significativité ( $p=0,0500$ ) pour le nombre d'ovocytes en métaphase II au moment de l'insémination mais un coefficient de corrélation très faible ( $r=0,0700$ ).

Cependant, l'étude statistique montre une corrélation significative pour les variables suivantes :

- Le type de protocole de stimulation ( $p=0,0200$ ) ;
- L'indication de la technique ( $p=0,0002$ ) ;
- Le changement de bain 3 heures après la FIV ( $p<0,0001$ ) ;
- Le pourcentage de formes typiques de spermatozoïdes ( $p<0,0001$  et  $r=0,2400$ ) ;
- La survie des spermatozoïdes ( $r=0,1500$ ).

Tableau 6-8. Résultats de l'analyse univariée du taux de fécondation en FIV classique

Variables indépendantes	Coefficients de corrélation r	p
Age Femme	-0,05	0,2100
Age Homme	- 0,21	0,4200
Forme typique	0,24	<0,0001*
Survie	0,15	<0,0001*
Nombre d'ovocytes intacts	0,07	0,6400
No. d'ovocytes mûrs	0,07	0,0500
Protocoles	-	0,0200*
Indications	-	0,0002*
Résultat de spermoculture	-	0,7000
Changement de bain à 3 heures	-	<0,0001*

\* : p significatif (< 0,0500)

#### 3-2-A-b. Analyse multivariée

L'ensemble des variables significatives ( $p<0,0500$ ) ainsi que celles dont le p était inférieur à 0,20 ont été entrées dans un modèle linéaire généralisé pour expliquer le taux de fécondation : formes typiques, survie, nombre d'ovocytes matures, type de protocole, indications, changement de bain 3 heures après la FIV .

À la suite de cette analyse multivariée, les variables suivantes sont indépendamment et significativement liées au taux de fécondation :

- Le type de protocole : un protocole court diminue le taux de fécondation par rapport à un protocole long ( $p=0,0030$ ).
- Le changement de bain à la 20<sup>e</sup> heure diminue le taux de fécondation par rapport au changement de bain à la 3<sup>e</sup> heure ( $p<0,0001$ ).
- Le taux de fécondation augmente avec celui du pourcentage de formes typiques ( $p<0,0001$ ) et de survie ( $p<0,0011$ ).

Tableau 6-9. Résultats de l'analyse multivariée du taux de fécondation en FIV classique

Variables indépendantes	$\beta$	p
Forme typique	0,0043	<0,0001*
Survie	0,0017	0,0011*
Protocole court	-0.0566	0,0320*
Pas de changement de bain	-0.1470	< 0,0001*

\* : p significatif (< 0,0500)

### 3-2-B.2. La grossesse biochimique en FIV classique

#### 3-2-B-a. Analyse univariée

Les résultats du transferts inconnus ( $n=4$ ) ont été considérées comme « valeurs manquantes ». Il existe une différence significative ( $p<0,0500$ ) avec l'ensemble des variables quantitatives suivantes :

- L'âge de la femme ;
- Le taux de fécondation ;
- Le nombre d'embryons transférés ;
- Le nombre d'embryons de type Z1-Z2 ;
- Le nombre d'embryons à OPN à H26 ;
- Le nombre d'embryons à 2 Cellules à H26 ;
- Le nombre d'embryons de type I4, II4+.

La variable « jour du transfert » a été recodée pour ne garder que J2, J3, J5 et J6. L'analyse par un test exact de Fischer ne montre pas de différence significative ( $p=0,5700$ ).



Tableau 6-10. Résultats de l'analyse univariée du taux de grossesses biochimiques en FIV classique

Variables indépendantes		p
Age Femme		<0,0001*
Taux de fécondation		0,0136*
Nombre d'embryons transférés		0,0006*
Parmi les embryons transférés	Nombre d'embryons classés Type Z1-Z2	0,0003*
	Nombre d'embryons classés 0 PN à la 26 <sup>e</sup> heure	0,0130*
	Nombre d'embryons à 2 cellules à la 26 <sup>e</sup> heure	0,0089*
	Nombre d'embryons classés I4, II4+	<0,0005*
Jour du transfert		0,5700

\* : p significatif (<0,0500)

### 3-2-B-b. Analyse multivariée

Les variables significatives ont été rentrées dans un modèle de régression logistique. Il n'est ressorti que quatre variables significativement indépendantes et liées à la grossesse biochimique. Il s'agit de :

- L'âge de la femme : une année supplémentaire augmente le risque de ne pas avoir de grossesse biochimique (odds ratio = 1,08 Intervalle de confiance à 95% = 1,04-1,13) donc diminue le taux de grossesses.

Alors que les trois variables ci-dessous augmentent les chances de grossesses biochimiques (diminuent le risque de ne pas avoir de grossesse biochimique) :

- Le nombre d'embryons de type Z1-Z2 ;
- Le nombre d'embryons à 0PN à H26 ;
- Le nombre d'embryons à 2 Cellules à H26 ;

Tableau 6-11. Résultats de l'analyse multivariée du taux de grossesses biochimiques en FIV classique

Variables indépendantes		Odds Ratio	Intervalle de confiance à 95%	p
Age Femme		1,08	1,04-1,13	0,0030*
Parmi les embryons	Nombre d'embryons classés Type Z1-Z2	0,73	0,57-0,94	0,0140*
	Nombre d'embryons classés 0 PN à la 26 <sup>e</sup> heure	0,65	0,48-0,89	0,0068*
	Nombre d'embryons à 2 cellules à la 26 <sup>e</sup> heure	0,66	0,50-0,89	0,0052*

\* : p significatif (<0,0500)

### 3-2-C. L'accouchement en FIV classique

#### 3-2-C-a. Analyse univariée

Toutes les variables quantitatives sont liées avec la variable accouchement :

- L'âge de la femme ;
- Le taux de fécondation ;
- Le nombre d'embryons transférés ;
- Le nombre d'embryons type Z1 ou Z2 ;
- Le nombre d'embryons à 0PN à la 26<sup>e</sup> heure ;
- Le nombre d'embryons à 2 cellules à la 26<sup>e</sup> heure ;
- Le nombre d'embryons type I4, II4+.

Tableau 6-12. Résultats de l'analyse univariée du taux d'accouchements en FIV classique

Variables indépendantes		p
Age Femme		<0,0001*
Taux de fécondation		<0,0001*
Nombre d'embryons transférés		<0,0001*
Parmi les embryons transférés	Nombre d'embryons classés Type Z1-Z2	<0,0001*
	Nombre d'embryons classés 0 PN à la 26 <sup>e</sup> heure	0,0008*
	Nombre d'embryons à 2 cellules à la 26 <sup>e</sup> heure	0,0008*
	Nombre d'embryons classés I4, II4+	0,0007*
Jour du transfert		0,6800

\* : p significatif (<0,0500)

Par contre, le jour de transfert n'est pas lié à la probabilité de survenue d'un accouchement (p = 0,6800 par test exact de Fischer).

#### 3-2-C-b. Analyse multivariée

Dans une régression logistique pas à pas descendante regroupant dans un premier temps l'ensemble des variables significatives, seules trois variables sont restées significativement indépendantes et liées à l'accouchement :

- L'âge de la femme : plus l'âge augmente, moins il y a d'accouchements.  
Alors que les variables ci-dessous favorisent les accouchements :
- Le nombre d'embryons à 0PN à la 26<sup>e</sup> heure ;
- Le nombre d'embryons à 2 cellules à la 26<sup>e</sup> heure.

Tableau 6-13. Résultats de l'analyse multivariée du taux d'accouchements en FIV classique

Variables indépendantes		Odds Ratio	Intervalle de confiance à 95%	p
Age Femme		1,08	1,04-1,13	0,0006*
Parmi les embryons transférés	Nombre d'embryons classés 0 PN à la 26 <sup>e</sup> heure	0,51	0,37-0,71	<0,0001*
	Nombre d'embryons à 2 cellules à la 26 <sup>e</sup> heure	0,64	0,47-0,86	0,0036*

\* : p significatif (< 0,0500)

### 3-2-D. L'accouchement de jumeaux en FIV classique

#### 3-2-D-a. Analyse univariée

L'âge de la femme est lié au risque d'accouchement de jumeaux ( $p = 0,0125$ ). Plus une femme est jeune, plus elle présente de risque d'accouchements multiples. De même, il y a une différence avec le nombre d'embryons transférés ( $p = 0,0010$ ), le nombre d'embryons transférés étant plus élevé dans les accouchements de jumeaux.

#### 3-2-D-b. Analyse multivariée

Dans une régression logistique, incluant au départ les deux variables significatives, seule la variable « âge » reste significativement liée et indépendante à l'accouchement de jumeaux. Une année supplémentaire diminue le risque d'accoucher de jumeaux par 0,898 (IC : 0,815-0,99).

### 3-3. Recherche de facteurs prédictifs en FIV avec ICSI

#### 3-3-A.1. Le taux de fécondation en FIV avec ICSI

##### 3-3-A-a. Analyse univariée

- Il n'y a pas de corrélation entre le taux de fécondation et l'âge de la femme ( $p=0,5000$ ), l'âge de l'homme ( $p=0,3800$ ) et le pourcentage de formes typique de spermatozoïdes ( $p=0,1900$ ). Le test Kuskal Wallis montre qu'aucun type de protocole n'est significatif ( $p= 0,4200$ ), de même aucune indication de l'ICSI ne ressort significativement ( $p= 0,0900$ ) et aucun résultat de spermoculture non plus ( $p= 0,0900$ ).
- Il existe une corrélation significative entre le taux de fécondation et le nombre d'ovocytes injectés ( $p= 0,0240$ ) mais néanmoins faible puisque le  $r$  est égal à 0,10.

### 3-3-A-b. Analyse multivariée

La variable significative « nombre d'ovocytes injectés » ( $p < 0,0500$ ) ainsi que celles dont le  $p$  était inférieur à 0,20 ont été entrées dans un modèle linéaire généralisé pour expliquer le taux de fécondation. Sur les trois variables rentrées (résultats de spermoculture, nombre d'ovocytes injectés et pourcentage de formes typiques), seule une variable est significativement liée de façon indépendante au taux de fécondation : le nombre d'ovocytes injectés. Plus ce nombre est important, plus le taux de fécondation augmente ( $p = 0,0330$ ).

### 3-3-B.2. La grossesse biochimique en FIV avec ICSI

#### 3-3-B-a. Analyse univariée

Il existe une différence significative ( $p < 0,0500$ ) avec l'ensemble des variables quantitatives :

- L'âge de la femme ;
- Le nombre d'embryons transférés ;
- Le nombre d'embryons de type Z1-Z2 ;
- Le nombre d'embryons à 2 Cellules à H26 ;
- Le nombre d'embryons de type I4, II4+ ;

La variable « jour du transfert » a été recodée pour ne garder que J2, J3, J5 et J6. L'analyse par un test exact de Fischer ne montre pas de différence significative entre les différents jours de transfert.

Tableau 6-14. Résultats de l'analyse univariée du taux de grossesses biochimiques en FIV avec ICSI

Variables indépendantes		p
Age Femme		0,0001*
Taux de fécondation		0,3662
Nombre d'embryons transférés		0,0010*
Parmi les embryons transférés	Nombre d'embryons classés Type Z1-Z2	0,0179*
	Nombre d'embryons classés O PN à la 26 <sup>e</sup> heure	0,2870
	Nombre d'embryons à 2 cellules à la 26 <sup>e</sup> heure	<0,0001*
	Nombre d'embryons classés I4, II4+	<0,0001*
Jour du transfert		0,5200

\* : p significatif ( $p < 0,0500$ )

#### 3-3-B-b. Analyse multivariée

Les variables significatives ont été rentrées dans un modèle de régression logistique. Trois variables persistent sur les cinq initialement décrites :

- L'âge de la femme : une année supplémentaire augmente le risque de ne pas avoir de grossesses biochimiques (odds ratio = 1,1 Intervalle de confiance à 95% = 1,04-1,16) donc diminue le taux de grossesse.

Alors que les deux variables ci-dessous augmentent les chances de grossesses biochimiques (diminuent le risque de ne pas avoir de grossesse biochimique) :

- Le nombre d'embryons à 2 Cellules à H26 ;
- Le nombre d'embryons de type I4, II4+.

Tableau 6-15. Résultats de l'analyse univariée du taux de grossesses biochimiques en FIV avec ICSI

Variables indépendantes		Odds Ratio	Intervalle de confiance à 95%	p
Age Femme		1,1	1,04-1,13	0,0009*
Parmi les embryons transférés	Nombre d'embryons à 2 cellules à la 26 <sup>e</sup> heure	0,55	0,41-0,75	0,0002*
	Nombre d'embryons classés I4, II4+	0,66	0,50-0,89 (à vérifier)	0,0032*

\* : p significatif (p < 0,0500)

### 3-3-C. L'accouchement en FIV avec ICSI

#### 3-3-C-a. Analyse univariée

Toutes les variables quantitatives sont liées avec la variable accouchement :

- L'âge de la femme ;
- Le taux de fécondation ;
- Le nombre d'embryons transférés ;
- Le nombre d'embryons de type Z1 ou Z2 ;
- Le nombre d'embryons à 2 cellules à la 26<sup>e</sup> heure ;
- Le nombre d'embryons de type I4, II4+.

Par contre, le jour de transfert n'est pas lié à la variable accouchement (p = 0,2100 par test exact de Fischer).

Tableau 6-16. Résultats de l'analyse univariée du taux d'accouchements en FIV avec ICSI

Variables indépendantes		p
Age Femme		0,0001
Taux de fécondation		<0,0001*
Nombre d'embryons transférés		<0,0001*
Parmi les embryons transférés	Nombre d'embryons classés Type Z1-Z2	0,0185*
	Nombre d'embryons classés O PN à la 26 <sup>e</sup> heure	0,5100
	Nombre d'embryons à 2 cellules à la 26 <sup>e</sup> heure	<0,0001*
	Nombre d'embryons classés I4, II4+	<0,0001*

\* : p significatif (p < 0,0500)

### 3-3-C-b. Analyse multivariée

Dans une régression logistique pas à pas descendante regroupant dans un premier temps l'ensemble des variables significatives, seules trois variables sont restées significativement indépendantes et liées à l'accouchement :

- L'âge de la femme : plus l'âge augmente, moins il y a d'accouchements; compte tenu de l'odds ratio, une année supplémentaire augmente le risque de ne pas accoucher par 1,09 (intervalle de confiance à 95% : 1,03-1,16).

Alors que les variables ci-dessous favorisent les accouchements (diminution du risque de ne pas accoucher) :

- Le nombre d'embryons à 2 cellules à la 26<sup>e</sup> heure ;
- Le nombre d'embryons de type I4, II4+.

Tableau 6-17. Résultats de l'analyse multivariée du taux d'accouchements en FIV avec ICSI

Variables indépendantes		Odds Ratio	Intervalle de confiance à 95%	p
Age Femme		1,09	1,03-1,16	0,0037*
Parmi les embryons transférés	Nombre d'embryons à 2 cellules à la 26 <sup>e</sup> heure	0,55	0,39-0,75	0,0002*
	Nombre d'embryons classés I4, II4+	0,6	0,50-0,89	0,0067*

\* : p significatif (p < 0,0500)

### 3-3-D. L'accouchement de jumeaux en FIV avec ICSI

#### 3-3-D-a. Analyse univariée

Seul l'âge de la femme est lié à l'accouchement de jumeaux (p = 0,0020). Plus la patiente est âgée, moins elle a de chance d'avoir des jumeaux. La variable « nombre d'embryons transférés » est à la limite de la significativité (p=0,0600). Elle est plus élevée lors de l'accouchement de jumeaux.

#### 3-3-D-b. Analyse multivariée

Dans une régression logistique pas à pas descendante incluant au départ les valeurs significatives (« l'âge ») ou dont le degré de significativité est inférieur à 0,2000 (« taux de fécondation » et « nombre d'embryons transférés »), seul l'âge reste significatif (p=0,0040). Plus une femme est jeune, plus elle présente un risque d'avoir des jumeaux. Ce risque diminue de 0,84 par année (OR à 0,84 et intervalle de confiance à 95% : 0,75-0,95).

### 3-4. Récapitulatif des facteurs prédictifs

Tableau 6-16. Variables statistiques et indépendantes en FIV classique et avec ICSI

Variables statistiques et indépendantes	FIV	ICSI
Protocole court	Diminue le taux de fécondation (p= 0,0320)	pas de liens statistique
Changement de bain à 3 heures	Augmente le taux de fécondation (p<0,0001)	pas de liens statistique
Pourcentage de survie des spermatozoïdes	Augmente le taux de fécondation (p=0,0011)	pas de liens statistique
Pourcentage de formes typiques de spermatozoïdes	Augmente le taux de fécondation (p<0,0001)	pas de liens statistique
Nombre d'ovocytes injectés	pas de liens statistique	Augmente le taux de fécondation (p= 0,0240)
Âge de la femme	Diminue le taux de grossesses (p=0,0030), le taux d'accouchements uniques (p=0,0006) et de jumeaux (p=0,0125)	Diminue le taux de grossesses (p=0,0009), le taux d'accouchements uniques (p=0,0037) et de jumeaux (p=0,0020)
Nombre d'embryons classés Type Z1-Z2	Augmente le taux de grossesses (p=0,0140)	pas de liens statistique
Nombre d'embryons classés O PN à la 26 <sup>e</sup> heure	Augmente le taux de grossesses biochimiques (p=0,0068) et le taux d'accouchements	pas de liens statistique
Nombre d'embryons à 2 cellules à la 26 <sup>e</sup> heure	Augmente le taux de grossesses (p=0,0052) et le taux d'accouchements (p= 0,0036)	Augmente le taux de grossesses (p=0,0002) et le taux d'accouchements (p=0,0002)
Nombre d'embryons classés I4, II4+	pas de liens statistique	Augmente le taux de grossesses (p=0,0032) et le taux d'accouchements (p=0,0067)

## 4. DISCUSSION

### Analyse descriptive

Les résultats des deux techniques de FIV de 2003 à 2006 au centre d'AMP de Limoge ont été comparées aux données nationales (rapport annuel de l'Agence de Biomédecine 2006 et FIVNAT 2006).

La population étudiée se caractérise tout d'abord par son âge. D'une manière générale, selon les données FIVNAT, l'âge des femmes ne paraît plus augmenter depuis 2003, tant sur la moyenne que sur le pourcentage de femmes de plus de 40 ans. On note en particulier que le pourcentage de femmes de plus de 41 ans a baissé de près de 2% en 2004, reflet possible de la réglementation. L'âge des hommes suit la même évolution que celui des femmes. En FIV et en ICSI, l'âge moyen des femmes et des hommes est sensiblement inférieur aux âges moyens recensés par FIVNAT sans qu'une différence significative soit démontrée. Comme au niveau

national, en ICSI, l'âge moyen des femmes est sensiblement inférieur par rapport à la population féminine en FIV classique.

Tableau 6-17. Moyenne d'âge de la population

		Limoges 2003 à 2006	FIVNAT				
			2000	2001	2002	2003	2004
FIV classique	Age moyen de la femme	33,6±4,4	34,4±4,5	34,5±4,5	34,7±4,6	34,7±4,6	34,4±4,5
	Age moyen de l'homme	35,7±5,7	36,2±5,9	36,5±5,8	36,6±5,9	36,4±5,8	36,4±5,8
FIV avec ICSI	Age moyen de la femme	33,0±4,5	33,2±4,6	33,2±4,6	33,4±4,7	33,3±4,7	33,2±4,6
	Age moyen de l'homme	35,4±5,6	36,2±6,3	36,1±6,2	36,3±6,3	36,2±6,3	36,1±6,2

Concernant la répartition de l'âge des femmes, il peut être noté que la proportion des femmes de plus de 43 ans est très faible à Limoges comparativement aux données nationales. De même, des différences existent dans la proportion des femmes de moins de 38 ans. En effet, il y a plus de femmes de moins de 38 ans en ICSI par rapport à la FIV classique (Agence de Biomédecine 2006). Cela est constaté aussi au niveau du centre d'AMP de Limoges. Par ailleurs, la proportion de femmes de moins de 38 ans est plus importante en FIV et en ICSI sur les données du centre d'AMP de Limoges comparées aux données nationales.

Tableau 6-18. Répartition de l'âge des femmes dans notre étude et dans le rapport de l'ABM en 2006

Age à la ponction	FIV classique de 2003 à 2006 à Limoges		ABM 2006	FIV avec ICSI de 2003 à 2006 à Limoges		ABM 2006
	Nombre	Pourcentage		Nombre	Pourcentage	
<30 ans	153	19,5 %	15,0 %	98	20,6 %	22,4%
30-34 ans	290	36,9 %	36,8 %	187	39,4 %	37,7%
35-37 ans	167	21,3 %	20,4 %	112	23,6 %	18,7%
38-39 ans	84	10,7 %	13,1 %	43	9,1 %	10,4%
40-42 ans	90	11,5 %	13,0 %	31	6,5 %	9,6%
≥ 43 ans	1	0,1 %	1,6 %	4	0,8 %	9,6%

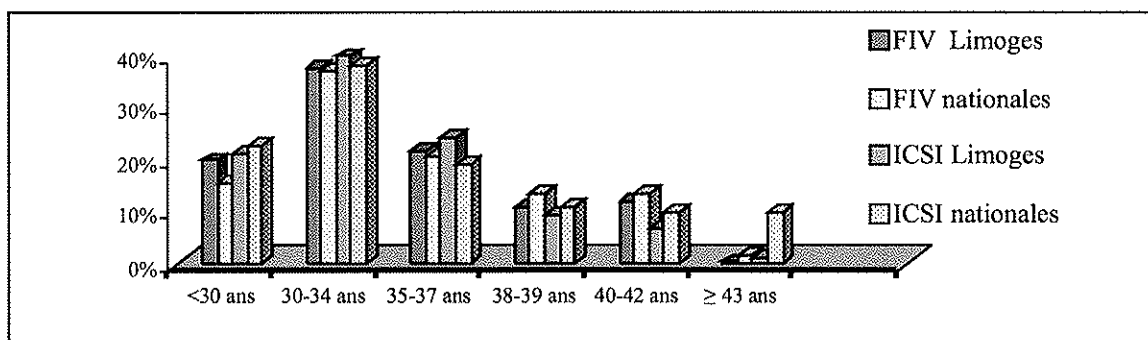


Figure 6-1. Répartition de l'âge de la femme dans notre étude de 2003 à 2006 comparativement aux données de l'ABM en 2006 en FIV classique et en FIV avec ICSI.



Concernant les indications dans notre population en FIV classique, elles sont en proportions identiques par rapport aux données nationales pour les causes idiopathiques et masculines. Les causes tubaires et les causes associées sont en proportion moins importantes à Limoges (tableau 6-19). Les données annuelles FIVNAT de 2000 à 2004 montrent que la part des ICSI réalisées avec un sperme normal augmente (tableau 6-20). Au centre d'AMP de Limoges, la part des indications masculines reste supérieure comparées aux données nationales en 2003 ou en 2004.

Tableau 6-19. Proportions des causes d'infertilités en FIV classique

FIV classique		
Indications	Limoges 2003 à 2006	Données FIVNAT 2003-2004
Associées	28,4%	37,8%
Inexpliquées	17,2%	16,4%
Masculines	19,8%	21,0%
Tubaires	7,3%	11,8%
Autres*	27,3%	13,0%

\* Exemples d'autres causes : dysovulation, endométriose

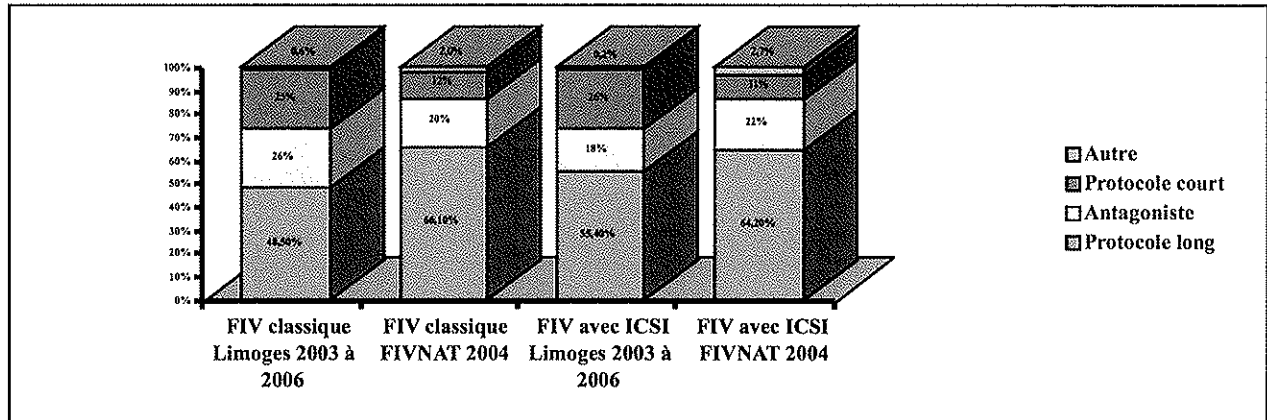
Tableau 6-20. Proportions des causes d'infertilités en FIV avec ICSI

FIV avec ICSI						
Indications	Limoges 2003 à 2006	Données FIVNAT				
		2000	2001	2002	2003	2004
Masculines	85,7%	73,1%	76,0%	71,0%	73,0%	69,7%
Echec AMP*	14,3%	27,9%	24,0%	29,0%	27,0%	30,3%

\*ICSI avec sperme normal

Concernant les types de protocoles utilisés lors de la stimulations ovarienne, les proportions des protocoles courts, longs et de protocoles antagonistes sont sensiblement les même d'une technique à l'autre dans notre centre (figure 6-2). Notons que les protocoles longs sont moins utilisés dans notre centre par rapport aux données nationales (48,5% versus 66,10% en FIV et 55,4% versus 64,2% en ICSI) mais par contre les protocoles courts sont plus utilisé. L'utilisation des antagonistes (par exemple *Cétrotide®*, Merck Serono, Lyon, France) a beaucoup augmenté au plan national depuis 1999, et elle s'est fait surtout aux dépens des agonistes en protocoles longs. Dans notre centre, les antagonistes sont utilisés depuis 2002.

Figure 6-2. Parts relatives de chaque protocole de stimulation



Concernant les spermocultures, en FIV et en ICSI, elles ne sont pas effectuées dans 14 à 22% des cas (volume de sperme insuffisant), négatives dans un tiers des cas, polybactériennes dans la moitié des cas. Enfin, l'isolement monomicrobien est plus rare : *Escherichia coli*, *Mycoplasma hominis* ou *Ureaplasma urealyticum* dans 1 à 2% des cas.

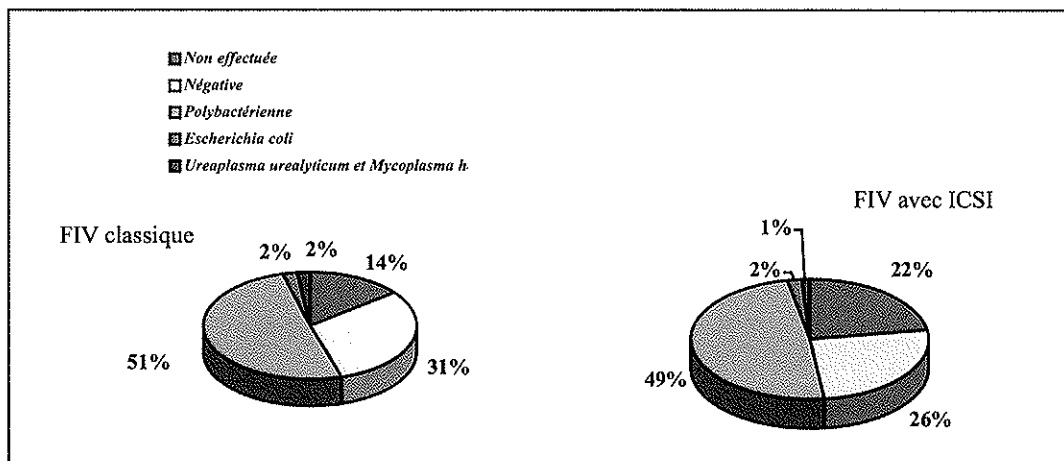


Figure 6-3. Résultats des spermocultures

En ce qui concerne le nombre d'ovocytes recueillis par ponction, il est plus important en ICSI par rapport au FIV sur le plan national et sur les données du centre (tableau 6-21). Cette situation s'explique par l'âge plus jeune des femmes ayant recours à une ICSI et par des indications différentes entre les techniques : pour les ICSI, les causes d'infertilité sont plutôt masculines ; en théorie, ces femmes répondront mieux à la stimulation ovarienne, et le recrutement folliculaire obtenu sera alors meilleur. Par ailleurs, le pourcentage d'ovocytes inséminés ou injectés par rapport au nombre d'ovocytes recueillis est globalement plus élevé en FIV qu'en ICSI (tableau 6-21). En effet, seuls les ovocytes mûrs sont injectés en ICSI alors que dans la technique classique, pratiquement tous les ovocytes sont inséminés sans connaître leur maturité. Le petit pourcentage non inséminé correspond aux ruptures de la membrane

pellucide et autres pertes d'ovocytes. En ICSI, 66% des ovocytes recueillis sont injectés (contre 74% en moyenne nationale). Ce pourcentage pourrait être amélioré par la stimulation ovarienne pour optimiser le nombre d'ovocyte en métaphase II. On peut aussi minimiser les pertes ovocytaires avec une décoronisation optimisée.

Contrairement à notre étude sur la période étudiée, le taux de fécondation n'a pas été publié par l'ABM. Sur nos données, il n'y a pas de différence retrouvée sur les taux de fécondation entre FIV et ICSI (tableau 6-21).

Tableau 6-21. Données relatives aux ovocytes et aux embryons dans notre étude et dans le rapport de l'Agence de Biomédecine en 2006

Paramètres descriptifs	FIV classique		FIV avec ICSI	
	Limoges 2003-2006	ABM 2006	Limoges 2003-2006	ABM 2006
<b>OVOCYTES</b>				
Nombre d'ovocytes recueillis/ponctions	8	8,8	8,9	9,5
Nombre moyen d'ovocytes inséminés ou injectés	7,9±5,4	ND	5,9±3,9	ND
% ovocytes inséminés ou injectés/recueillis	98,0%	94,7%	66,0%	73,9%
Taux de fécondation	50%±30%	ND	50%±30%	ND
<b>EMBRYONS</b>				
Nombre moyen d'embryons obtenus/tentative	3,2±3,2	ND	3,0±2,7	ND
% embryons obtenus/ovocytes inséminés	40,0%	57,9%	51,0%	65,8%
% embryons congelés/embryons obtenus	14,0%	23,0%	14,0%	22,0%
% embryons transférés ou congelés/embryons obtenus	59,0%	57,0%	65,0%	60,0%

- : données non précisées ; Taux de fécondation : rapport du nombre de zygotes normaux sur le nombre d'ovocytes en métaphase II ; ND : données non disponibles.

D'une manière générale (sur les données nationales et locales), le pourcentage d'embryons obtenus par ovocytes inséminés ou injectés est plus élevé en ICSI (tableau 6-21). En effet, en FIV les ovocytes non mûrs sont aussi inséminés mais ne seront pas aptes à assurer un développement embryonnaire. En FIV, on peut augmenter ce taux de fécondation et le pourcentage d'embryons obtenus en contrôlant rigoureusement les conditions de culture (température, pH, pourcentage de CO<sub>2</sub>, osmolarité) et en modifiant quelques paramètres techniques : volume d'insémination, milieu nutritif différent pendant les trois premiers jours comme l'*ISMI*<sup>®</sup> (*Medicult*, Limonest, France) d'utilisation plus récente, changement de durée de co-incubation des gamètes, etc. On observe que ce pourcentage d'embryons était moins élevé à Limoges par rapport aux moyennes nationales quelle que soit la technique : en FIV 39 versus 58% et en ICSI, 51% versus 66%. Depuis certains changements mis en place, ce pourcentage d'embryons obtenus a augmenté en 2007 dans notre laboratoire (47% en FIV et 65% en ICSI).

Concernant le taux de congélation au niveau national, 20% des embryons obtenus sont congelés quelle que soit la technique d'AMP (tableau 6-21). À Limoges, les chiffres rapportés sont inférieurs (autour de 15%) et cela peut s'expliquer par le fait que nous obtenons moins d'embryons donc moins d'embryons surnuméraires à congeler (dans 59% de FIV et 65% des ICSI où l'on a pu congeler ou transférer). On peut aussi expliquer cette différence par les variations des critères de congélations d'un centre à l'autre. Soulignons que dans notre centre, seuls les embryons de qualité optimale sont congelés, permettant ainsi d'avoir une bonne survie des embryons à la décongélation (72%) et un bon taux de grossesse après TEC (25% de taux de grossesses).

Concernant les transferts, plus de la moitié des transferts en FIV classique ont eu lieu au deuxième jour après la ponction ovocytaire (figure 6-4). Le type de cathéter le plus souvent utilisé est le double lumière, puis le cathéter simple et enfin le cathéter difficile (figure 6-5). Le pourcentage de transferts par ponction est globalement plus élevé sur deux plans : d'une part en ICSI par rapport aux FIV et d'autre part sur les données nationales par rapport aux résultats de Limoges (tableau 6-22). Cela peut être expliqué par les résultats soulignés auparavant car le nombre d'embryons obtenus est plus élevé en ICSI permettant d'éviter plus souvent l'absence d'embryon et donc l'absence de transfert. Il faut aussi intégrer la notion que l'ICSI a débuté dans notre centre fin 2002 et qu'il existe une courbe d'apprentissage pour cette technique. En 2007 et 2008, les pourcentages de transferts par ponction sont respectivement de 83% et de 87% et alors équivalents aux pourcentages observés au niveau national. D'une technique à l'autre, il n'y a plus de différence concernant le nombre moyen d'embryons par transfert dans notre centre et il faut souligner que cette moyenne est inférieure comparée aux données nationales (1,8 versus 2).

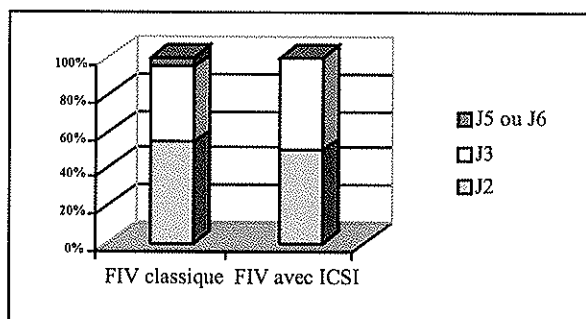


Figure 6-4. Répartition des jours de transferts

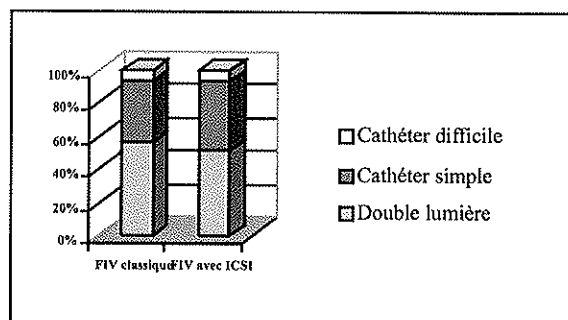


Figure 6-5. Répartition des types de cathéters

Tableau 6-22. Analyse des taux de grossesses dans notre étude et dans le rapport de l'ABM en 2006

	FIV classique		FIV avec ICSI	
	Limoges 2003-2006	ABM 2006	Limoges 2003-2006	ABM 2006
<b>Nombre de tentatives ou ponctions</b>	785	19 868	475	29 786
<b>Nombre de transferts</b>	611	15 984	397	24 524
<i>% de transferts par ponction</i>	77,8%	84,2%	83,6%	87,1%
<i>Nombre moyen d'embryons par transfert</i>	1,8±0,5	2,0	1,8±0,5	2,0
<b>Nombre de grossesses</b>	207	ND	137	ND
<i>% par ponction</i>	26,3%	ND	28,8%	ND
<i>% par transfert</i>	33,3%	ND	34,5%	ND
<b>Nombre de grossesses échographiques</b>	196	ND	118	ND
<i>% par ponction</i>	24,9%	24,3%	24,8%	25,8%
<i>% par transfert</i>	32,0%	28,8%	29,7%	29,5%
<b>Nombre de grossesses évolutives</b>	167	ND	110	ND
<i>% par ponction</i>	21,2%	19,4%	23,1%	21,0%
<i>% par transfert</i>	27,3%	ND	27,7%	ND

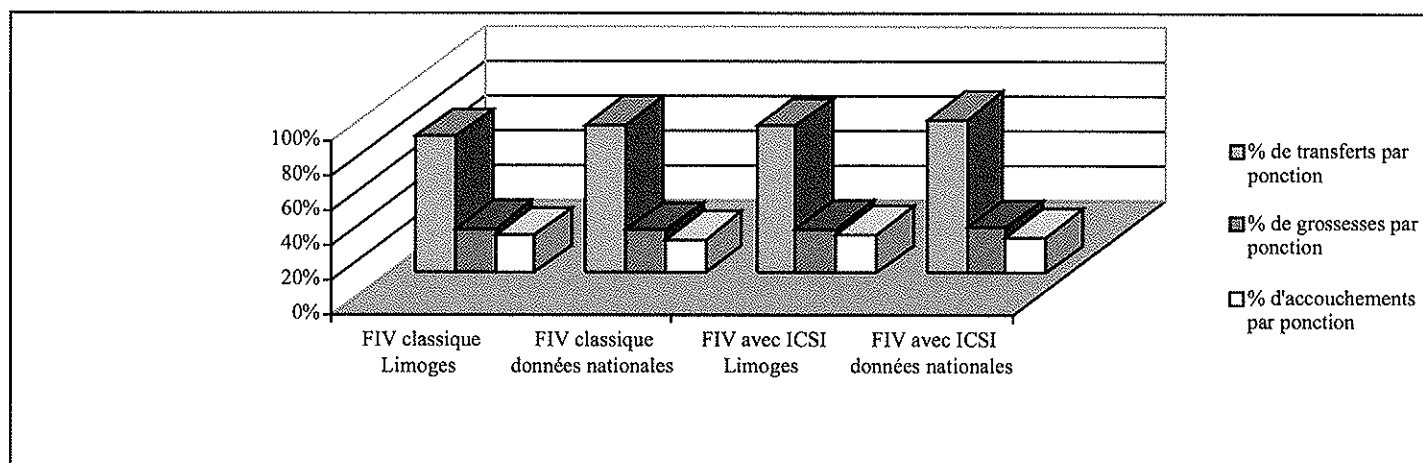
ND : données non disponibles

En ce qui concerne les taux de grossesses, le pourcentage de grossesses par ponction est de 25% au niveau national quelle que soit la technique et ce résultat est équivalent sur les données du centre d'AMP de Limoges (tableau 6-22). Les taux d'accouchements sont supérieurs à Limoges par rapport aux données nationales (tableau 6-23). Mais le taux de grossesses gémellaires est aussi supérieur dans notre centre quelle que soit la technique, et ce, malgré un nombre moyen d'embryons par transfert plus faible. Cependant il n'y a pas de grossesse triple contrairement aux données nationales (0,4% d'accouchements triples et plus en FIV et 0,5% en ICSI en 2006 selon l'ABM). Le pourcentage de FCS précoces et des GEU à Limoges est aussi inférieur aux taux retrouvés au niveau national. À Limoges comme au niveau national, le taux d'interruptions médicales de grossesses est inférieur à 1% des grossesses échographiques. Finalement, le résultat global en termes d'accouchement par ponction est supérieur au centre d'AMP de Limoges, quelle que soit la technique, comparé à la moyenne nationale (tableau 6-23 et figure 6-6).

Tableau 6-23. Analyse des taux de grossesses dans notre étude et dans le rapport de l'ABM en 2006

	FIV classique		FIV avec ICSI	
	Limoges	ABM	Limoges	ABM
	2003-2006	2006	2003-2006	2006
<b>Nombre d'accouchements</b>	163	-	108	-
% par ponction	20,7%	18,7%	22,0%	20,3%
% par transfert	26,6%	22,2%	27,2%	23,2%
% par grossesse échographique	83%	77,2%	91,0%	-
% accouchements uniques	75,0%	78,2%	76,0%	80,1%
% accouchements gémellaires	25,0%	21,4%	24,0%	19,3%
% FCS précoce et GEU/grossesse échographique	9%	20,7%	7%	19,6%
% FCS tardives/grossesse échographique	1,5%	1,3%	1,7%	1,1%
% IMG/ grossesse échographique	0,5%	0,9%	0,8%	0,6%

Figure 6-6. Pourcentage de transferts, de grossesses et d'accouchements par ponction



## Les facteurs prédictifs

On constate que le fait d'utiliser un protocole court lors de la stimulation ovarienne diminue le taux de fécondation. Ce facteur prédictif négatif est admis depuis longtemps : il a été montré que le protocole court donne de moins bons résultats comparés au protocole long en matière de nombre d'ovocytes récupérés, de taux de fécondation, de nombre d'embryons obtenus et de transferts (Tasdemir *et al.*, 1995) ainsi qu'en termes de taux de grossesse (Tasdemir *et al.*, 1995 ; Daya *et al.*, 2000). Cependant, Hedon *et al.* (1995) précise que le taux de grossesse et le taux d'implantation sont augmentés en protocole long, mais que le taux de fécondation est inchangé. Ces mauvais résultats en protocoles courts ne sont pas surprenants dans la mesure où ils sont prescrits chez des femmes susceptibles d'être mauvaises répondeuses, avec un âge plus élevé, une réserve ovarienne faible ou avec un antécédent d'échec de stimulation en protocole long. Dans notre étude, la répartition de l'âge

des patientes est en effet différente entre protocole court d'une part et protocole long et antagoniste d'autre part (figure 6-7).

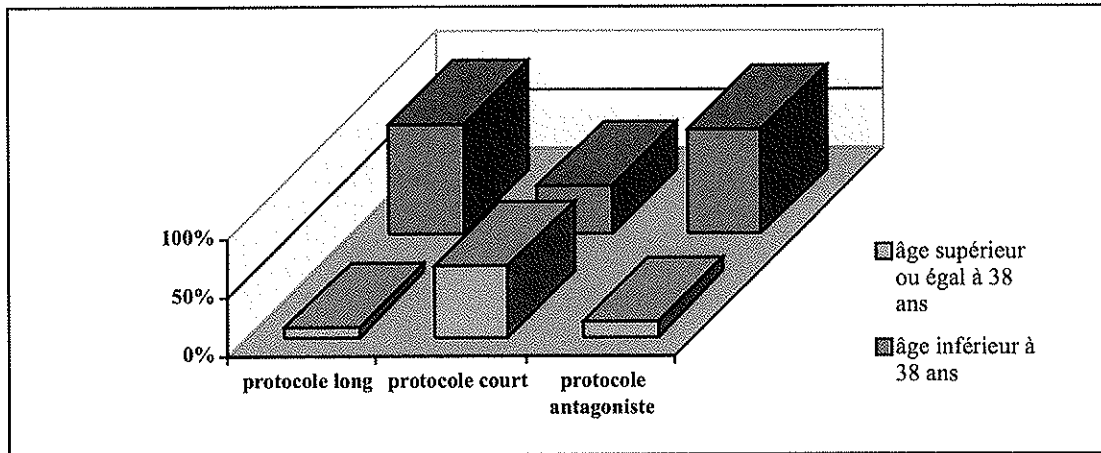


Figure 6-7. Répartition de l'âge des femmes en fonction du type de protocole de stimulation

Dans notre étude, il a été montré une relation significative entre le pourcentage de formes typiques et le taux de fécondation d'une part et entre le pourcentage de spermatozoïdes survivants 17 heures après la FIV et le taux de fécondation d'autre part. Il serait donc intéressant de déterminer un pourcentage seuil de formes typiques et de survie en dessous duquel un taux de fécondation minimal de 20% devrait être atteint. En effet, en dessous de ce seuil de 20% de fécondation en FIV classique (avec absence de développement embryonnaire, de transfert ou de grossesse), la technique doit être considérée comme un échec et orienter la tentative ultérieure vers une ICSI. Ainsi, afin d'éviter ces échecs, le test de migration et survie réalisé lors du bilan préalable pourrait nous orienter pour un choix de la technique la plus appropriée. Cependant la détermination de ces seuils à partir de cette étude n'est pas simple car il n'existe pas de relation linéaire entre ces différentes variables et le taux de fécondation. Concernant les formes typiques, on a tenté d'établir une courbe ROC pour le seuil de 20% de fécondation (figure 6-8). Cette courbe montre qu'au-dessous de 22% de formes typiques, le taux de fécondation sera inférieur à 20% mais avec une sensibilité et une spécificité faibles (respectivement 57% et 64%). La courbe se rapprochant de la diagonale illustre le manque de discrimination et de qualité de ce critère pris individuellement.

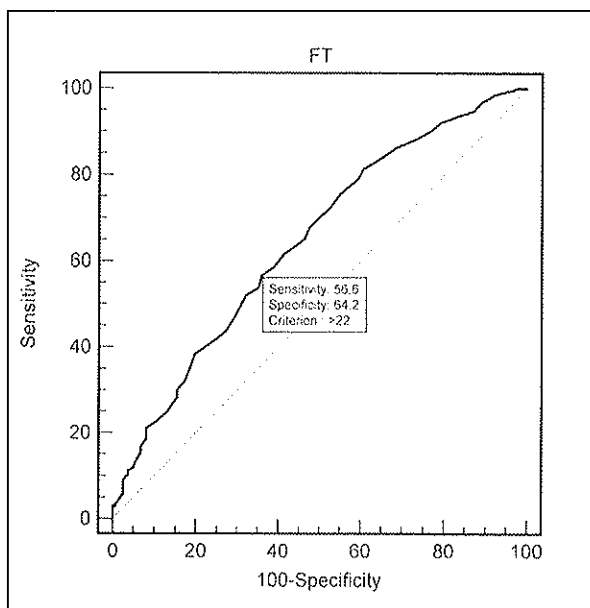


Figure 6-8. Courbe ROC reliant le pourcentage de formes typiques au taux de fécondation

Ce manque de sensibilité et de spécificité peut d'une part, être expliqué par les multiples facteurs liés au taux de fécondation et d'autre part, par la distribution très irrégulière des valeurs de forme typique (de 0 à 100%). En effet, s'il est vrai qu'aucune tentative avec un pourcentage de forme typique à 0% avant traitement du sperme, n'a abouti à une fécondation (n=3), il existe des cas extrêmes où l'on obtient avec 1% de formes typiques avant migration un taux de fécondation important (n=3). Et à l'inverse, il existe dans notre étude des tentatives où le taux de fécondation est à 0% alors que le pourcentage de formes typiques est supérieur à 20% (n= 60). Ces résultats s'expliqueraient par l'influence d'autres facteurs, comme les facteurs féminins, qui entrent en jeu au moment de la fécondation.

Tableau 6-24. Nombre de tentatives avec un taux de fécondation extrême en fonction du pourcentage de formes typiques (n=121)

71 tentatives avec 0% de taux de fécondation	≤ 20% de formes typiques
23 tentatives avec 0% de taux de fécondation	Entre 20% et 30% de formes typiques
27 tentatives avec 0% de taux de fécondation	≥ 30% de formes typiques

De façon plus rigoureuse, si l'on veut déterminer cette valeur seuil lors du choix de la technique, une étude complémentaire doit être menée sur un échantillon n'incluant que les tentatives de FIV classique avec indication masculine isolée et ceci afin de se soustraire à l'influence de facteurs féminins associés.

Par ailleurs, la détermination du pourcentage de formes typiques et de la survie est soumise à des variations selon les observateurs. En effet, ce sont les techniciens du laboratoire qui



déterminent le pourcentage de formes typiques et la survie des spermatozoïdes. Afin d'évaluer une possible variabilité interindividuelle et de diminuer ce biais de mesure, il faudrait mettre en place un contrôle de qualité interne afin d'évaluer et de corriger les variations inter-observateurs. Dans l'idéal, il est possible de déterminer de façon objective la quantification des formes typiques en utilisant un analyseur automatisé de la mobilité et de la morphologie (*Hamilton Thorne*<sup>®</sup>). Les centres utilisant cet appareil optent pour un seuil de 14% de formes typiques au-dessous duquel l'ICSI est la technique choisie d'emblée. Enfin, il faut souligner que la littérature internationale fait référence à la classification de Krüger pour évaluer la morphologie des spermatozoïdes, alors qu'en France la classification de David est plus couramment utilisée. Au-delà de différences techniques concernant les types de colorations, la classification de Krüger est reconnue comme utilisant des critères plus stricts. Par exemple, la présence d'une seule vacuole au niveau de la tête du spermatozoïde est considérée comme une atypie dans la classification de Krüger, alors que le même spermatozoïde sera considéré comme normal avec la classification de David. Ainsi, avec cette classification internationale stricte, et donc moins soumise à des variations d'interprétation, le seuil de 14% de formes typiques est retenu, en-dessous duquel l'ICSI est la technique choisie d'emblée.

En ce qui concerne le facteur « changement de bain 3 heures après la FIV », il faut savoir que les protocoles standards de FIV préconisent une co-incubation des gamètes d'environ 18 heures en sachant que 80% des ovocytes sont fécondés après une heure de mise en contact avec les spermatozoïdes (*Gianaroli et al.*, 1996). Le métabolisme cellulaire des spermatozoïdes libère des agents toxiques comme les radicaux libres pouvant être à l'origine de fragmentation de l'ADN et d'arrêt du développement embryonnaire. Pour éviter l'effet délétère de ces produits de dégradation sans baisser les chances de fécondation, des études ont proposé de réduire le temps de co-incubation. Certaines ont montré une amélioration de la qualité embryonnaire et du taux de grossesse avec un changement de bain entre une à quatre heures après l'insémination (*Gianaroli et al.*, 1996 ; *Dirnfeld et al.*, 1999 ; *Kattera et al.*, 2003). D'autres n'ont pas montré ni d'amélioration du taux de fécondation (*Ménézo et al.*, 2000) ni de la qualité embryonnaire, ni du taux de grossesses (*Coskun et al.*, 1998 ; *Swenson et al.*, 2000). Concernant le taux de fécondation et le temps de co-incubation, il n'y a généralement pas de variation mise en évidence sauf dans l'étude décrite par *Lundqvist et al.* en 2001 où une baisse du taux de fécondation a été observée dans le groupe ayant bénéficié d'une courte incubation.

Tableau 6-25. Tableau récapitulatif des publications sur un incubation raccourcie en FIV classique

Référence de l'étude	Temps de co-incubation courte	Temps d'incubation standard	Taux de fécondation	Qualité embryonnaire	Taux d'implantation	Taux de grossesses
Gianaroli <i>et al.</i> , 1996	1 H	16 H	+	=	+	+
Coskun <i>et al.</i> , 1998	1 H	18 H	=	=	ND	ND
Dirnfeld <i>et al.</i> , 1999	1 H	16 à 20 H	=	+	+	+
Ménezo <i>et al.</i> , 2000	3 H	ND	=	ND	=	=
Swenson <i>et al.</i> , 2000	2 H	16 à 20 H	=	ND	=	=
Lundqvist <i>et al.</i> en 2001	2 H	16 à 20 H	-	=	-	-
Kattera <i>et al.</i> , 2003	2 H	20 H	=	+	+	+
Barraud-Lange <i>et al.</i> , 2008	1 H	18 H	-	=	=	=
Etude à Limoges (2003-2006)	3 H	16 à 20 H	+	ND	ND	ND

+ : amélioration avec le temps d'incubation raccourci ; - : diminution avec le temps d'incubation raccourci ;  
 = : pas de différence ; H : durée d'incubation en heures ; ND : données non disponibles

Dans nos résultats, nous avons montré une amélioration significative du taux de fécondation avec le changement de bain au bout de 3 heures par rapport à une incubation longue. Enfin une étude plus récente (Barraud-Lange *et al.*, 2008) a montré une baisse significative du taux de fécondation en cas de courte insémination, sans variation du taux de polyspermie, ni amélioration significative de la qualité embryonnaire au deuxième et troisième jour. Dans cette étude, la durée de co-incubation n'était que d'une heure, alors que le changement de bain dans notre étude était effectué au bout de trois heures. Compte tenu de la réorganisation au niveau du laboratoire que demande le changement de bain au bout de trois heures au lieu de dix-huit heures et des résultats de la littérature, ce point nécessite d'être réévalué en détail avec une étude complémentaire. L'étude de deux groupes comparables (âge de la femme et qualité du sperme) cherchera à démontrer ou non un réel bénéfice du changement de bain précoce, en termes de taux de fécondation, de taux de polyspermie, de qualité embryonnaire, de taux d'implantation et de taux de grossesses.

Par ailleurs, notre étude a montré que le taux de fécondation augmente avec le nombre d'ovocytes injectés en ICSI. Les échecs de fécondation en ICSI peuvent être d'origine ovocytaires (Flaherty *et al.*, 1998). Melie *et al.* (2003), a analysé l'influence du nombre d'ovocytes récupérés à la ponction (n=452) pour une FIV avec ICSI, et n'a pas trouvé de différence significative entre les taux de fécondation des groupes (1 à 5 ovocytes, 6 à 10, 11 à 15, et plus de 15 ovocytes). Cependant les résultats ont montré une diminution significative

des taux de grossesses dans le groupe avec moins de 5 ovocytes à la ponction. Une étude dans notre centre a analysé rétrospectivement deux groupes sur la période 2000 à 2005 (en FIV en ICSI): groupe 1, trois ovocytes ou moins récupérés à la ponction (n=249) et groupe 2, au moins 4 ovocytes à la ponction (n=1248). L'analyse n'a pas fait l'objet d'une étude statistique donc il n'est pas certain que les différences observées soient significatives mais les résultats obtenus (tableau 6-26) confirment l'impact du nombre d'ovocytes recueillis sur les chances d'accouchements. Ces résultats doivent nous influencer lors d'une stimulation ovarienne avec réponse faible ( $\leq 3$  follicules matures), pour proposer d'arrêter la stimulation sans aller jusqu'à la ponction.

Tableau 6-26. Taux de grossesses et d'accouchements en fonction du nombre d'ovocytes récupérés à la ponction

	$\leq 3$ ovocytes à la ponction	$> 3$ ovocytes à la ponction
Taux de transferts	58%	84%
<b>Taux de grossesses par ponction</b>	<b>13%</b>	<b>29%</b>
Taux de grossesses par transfert	23%	35%
Taux d'accouchements par ponction	10%	24%
<b>Taux d'accouchements par transfert</b>	<b>17%</b>	<b>28%</b>

En FIV et en ICSI, l'âge de la femme est un facteur pronostique du taux de grossesses et du taux d'accouchements mais aussi du taux d'implantation embryonnaire. Ainsi dans notre étude, le risque de grossesse gémellaire diminue quand l'âge de la mère augmente. Le lien entre l'âge et les taux de grossesses et d'accouchements est mis en évidence depuis longtemps (Templeton *et al.*, 1996 ; Thurin *et al.*, 2005). Notre centre adopte d'ailleurs une stratégie de transfert qui propose aux couples dont la femme a plus de 40 ans, de replacer trois embryons, après accord du gynécologue et en fonction du bilan gynéco-obstétrical. Cela permet d'augmenter les chances d'accouchements sans augmenter le risque de grossesse multiple de manière importante. Cette pratique a été mise en place après une étude rétrospective portant sur 110 transferts chez des femmes de 40 ans ou plus, ayant bénéficié d'une FIV (tableau 6-27).

Tableau 6-27. Résultats des transferts de 2000 à 2006 des femmes de 40 ans ou plus

	1 embryon transféré	2 embryons transférés	3 embryons transférés	Total
Nombre de transferts	30	62	18	110
% grossesses cliniques/ transfert	10%	21%	33%	20%
% accouchements/transfert	7%	15%	22%	14%
% d'accouchements de jumeaux	0%	0%	25%	7%

En plus de la baisse du nombre et de la qualité des ovocytes obtenus à la ponction, ce déclin de la fertilité semble être dû à la difficulté de l'embryon à évoluer jusqu'au stade de blastocyste, et à la baisse de la réceptivité utérine. C'est pourquoi certains auteurs proposent un transfert d'embryons au stade de blastocyste chez les femmes après 40 ans (Janny *et al.*, 1996 ; Shapiro *et al.*, 2002). Cette culture prolongée est proposée aussi dans notre centre mais dans d'autres indications.

Concernant les hommes, l'étude statistique ne montre pas de relation statistique entre l'âge et les différentes variables dépendantes étudiées. Néanmoins, une enquête descriptive menée au Royaume-Uni de 2000 à 2001 a montré un lien entre le délai à concevoir et l'âge croissant de l'homme (Hassan *et al.*, 2003). D'après cette étude, le délai à concevoir est augmenté de façon significative dans les groupes des hommes âgés de plus de 45 ans.

En ce qui concerne les caractéristiques optimales de l'embryon, notre étude montre un lien significatif entre le taux de grossesses et le nombre de zygote type Z1-Z2 en FIV classique mais de nombreuses études sur l'influence de cette classification sont contradictoires.

Certaines études vont dans le même sens que nos résultats : il semble exister un lien statistique entre la morphologie des noyaux du zygote et un meilleur taux de grossesse. En 1999, Tesarik et Greko ont classé les zygotes en six types (de 0 à 5) selon la taille, le nombre et la distribution des précurseurs de nucléoles. Une forte association entre la classe 0 et le taux de grossesses a été trouvée. En 2000, Scott *et al.* ont établi une autre classification basée sur la taille des corpuscules précurseurs des nucléoles et leur position (polarisée ou non) dans chaque *pronuclei*. Ils ont montré qu'au stade du zygote, plus les nucléoles étaient réguliers et alignés (type Z1-Z2), plus le taux de formation de blastocystes était élevé (49,5% contre 28% avec les autres types). Cette étude a montré ensuite un taux de grossesses et d'implantation plus élevé avec les embryons issus de zygotes Z1 ou Z2 avec un transfert à J3 ou à J5. C'est cette classification qui est utilisée à Limoges. D'autres études ont ensuite confirmé ces résultats, en montrant le lien entre un Z-score optimal et un meilleur potentiel de développement jusqu'au stade de blastocyste (Balaban *et al.*, 2001 ; Zollner *et al.*, 2002 ; Lan *et al.*, 2003, Scott *et al.*, 2007) ou un lien avec de meilleurs taux de grossesses (Montag *et al.*, 2001). Le centriole, dérivé du spermatozoïde apparie et aligne les *pronuclei* mâle et femelle l'un par rapport à l'autre. Dans l'idéal, les deux *pronuclei* doivent être de taille égale et apparaissent collés l'un à l'autre pour que se déroulent le plus facilement les étapes ultérieures de développement de l'embryon (Scott *et al.*, 2000). Il est d'ailleurs montré que la qualité du zygote peut préjuger de la qualité embryonnaire à J3 (Lan *et al.*, 2003).

Tableau 6-28. Tableau récapitulatif des publications concernant la classification du zygote à J1

Référence de l'étude	classification	Technique	blastocyste	Qualité embryonnaire	Taux d'implantation	Taux de grossesses
Tesarik et Greko <i>et al.</i> , 1999	Tesarik et Greko	FIV et ICSI	ND	+	ND	+
Scott <i>et al.</i> , 2000	Scott et Smith	FIV et ICSI	+	ND	+	+
Balaban <i>et al.</i> , 2001	Tesarik et Greko	ICSI	+	+	+	+
Montag <i>et al.</i> , 2001	Tesarik et Greko	FIV et ICSI	ND	ND	+	+
Salumet <i>et al.</i> , 2001	Scott et Smith	FIV et ICSI	ND	=	=	=
De Placido <i>et al.</i> , 2002	Zygote scoring system	ICSI	ND	=	=	=
Zollner <i>et al.</i> , 2002	Zygote scoring system	FIV et ICSI	+	ND	=	=
Lan <i>et al.</i> , 2003	Scott et Smith	FIV et ICSI	+	+	=	=
James <i>et al.</i> , 2006	Scott et Smith	FIV et ICSI	ND	ND	=	=
Nicoli <i>et al.</i> , 2007	Scott et Smith	FIV et ICSI	ND	=	=	=
Scott <i>et al.</i> , 2007	Scott et Smith	FIV et ICSI	ND	ND	+	ND
Etude à Limoges (2003-2006)	Scott et Smith	FIV	ND	ND	ND	+
Etude à Limoges (2003-2006)	Scott et Smith	ICSI	ND	ND	ND	+

+ : amélioration avec les zygotes caractéristiques (Z-score); - : avec les zygotes caractéristiques; = : pas de différence entre les groupes ; blastocyste : développement jusqu'au stade de blastocyste ; ND : données non disponibles

D'autres études établissent que le lien entre cette classification précoce dans le développement embryonnaire et le potentiel d'implantation n'est pas toujours démontré. Certaines études ont notamment montré que le Z-Score peut être utile et complémentaire pour augmenter les taux de grossesses et d'implantation, mais ne peut absolument pas remplacer l'évaluation morphologique des embryons le jour du transfert (Salumet *et al.*, 2001 ; De Placido *et al.*, 2002 ; James *et al.*, 2006 ; Nicoli *et al.*, 2007). De plus, le lien entre le grade de l'embryon à J3 et la qualité du zygote est controversé (Salumet *et al.*, 2001 ; De Placido *et al.*, 2002).

Au final, plusieurs nuances sont à souligner dans notre étude : d'une part, les deux techniques (FIV et ICSI) sont étudiées de façon distinctes et ce n'est que dans l'étude FIV classique que l'on a retrouvé ce lien statistique entre le taux de grossesses et le nombre d'embryons issus d'un zygote classé de type Z1-Z2. D'autre part, cette évaluation reste subjective et l'influence d'éventuelles variations inter-observateurs est possible. Enfin, dans notre travail et dans la plupart des études citées auparavant, deux ou trois embryons sont transférés. Ainsi, l'estimation du potentiel implantatoire de chaque embryon n'est pas rigoureuse. Pour

véritablement évaluer la capacité de l'embryon à s'implanter et l'impact du critère du Z-Score, il est préférable d'étudier les transferts d'un seul embryon (Salumet *et al.*, 2001).

Notre étude a aussi mis en évidence qu'il existe un lien entre le taux de grossesses, d'accouchements et la division embryonnaire précoce à H26, quelle que soit la technique de FIV utilisée. Beaucoup d'auteurs ont montré ce lien prédictif positif entre clivage précoce et taux d'implantation et de grossesses (Sakkas *et al.*, 2001 ; Lundin *et al.*, 2001 ; Bos-Mikich *et al.*, 2001). Le clivage précoce a été proposé comme critère complémentaire pour sélectionner les embryons à transférer (Fenwick *et al.*, 2002). Il a été aussi montré que la division précoce à la 26<sup>e</sup> heure (entre 25 et 27 heures après l'insémination) est prédictif de la qualité de la morphologie des embryons à J2 (Fenwick *et al.*, 2002) et du potentiel de développement jusqu'au stade de blastocyste (Neuber *et al.*, 2003). Des études sur des transferts d'un seul embryon (SET : single embryo transfer) montrent que le clivage précoce est lié à un taux plus élevé de grossesses (Salumets *et al.*, 2003 ; Van Montfoort *et al.*, 2004).

Alors que dans la plupart des publications les groupes comparés concernant ce clivage précoce étudient le groupe avec clivage précoce (2 cellules) ou le groupe sans clivage précoce (2PN et 0PN), dans notre travail, trois groupes sont différenciés lors de l'évaluation à la 26<sup>e</sup> heure (à H26) : 2PN, 0PN et stade 2 cellules. De rares études utilisent cette classification, mais c'est le cas de l'étude de Neuber (2003) qui démontre ainsi un lien entre le potentiel de développement jusqu'au stade de blastocyste et les embryons classés 0PN ou à 2 cellules. De plus, ces embryons à 2 cellules sont de meilleure qualité lors de l'évaluation morphologique à J2 et J3 (nombre de cellules et absence de fragments cellulaires). L'étude de Chen et Kattera (2006) différencie là aussi les trois groupes et l'on note qu'en termes de taux de grossesses et d'implantation, il existe une différence significative positive entre d'une part le groupe des embryons à 2 cellules versus le groupe des 2PN, et d'autre part le groupe des 0PN versus le groupe des 2PN. Par ailleurs, ces taux sont plus élevés aussi entre le groupe à 2 cellules par rapport au 0PN, mais la différence n'est pas significative statistiquement. Enfin cette étude montre qu'il existe un lien statistique entre la morphologie du zygote et l'aspect à la 26<sup>e</sup> heure : la polarisation des nucléoles et leur régularité au sein des *pronuclei* semble prédictif d'un clivage précoce et d'un meilleur développement embryonnaire.

Tableau 6-29. Tableau récapitulatif des publications concernant la division précoce

Référence de l'étude	Classification*	Technique	Durée entre et l'observation l'insémination	blastocyste	Qualité embryonnaire	Taux d'implantation	Taux de grossesses
Sakkas <i>et al.</i> , 2001	EC-NEC	FIV et ICSI	25 à 27 H	ND	ND	+	+
Lundin <i>et al.</i> , 2001	EC-NEC	FIV et ICSI	25 à 27 H	ND	+	+	+
Bos-Mikich <i>et al.</i> , 2001	EC-NEC	FIV et ICSI	25 à 27 H	ND	ND	+	+
Fenwick <i>et al.</i> , 2002	EC-NEC	FIV	25 H	+	+	ND	ND
Neuber <i>et al.</i> , 2003	2PN, 0PN et stade 2 cellules	FIV et ICSI	23 à 28 H	+(OPN et embryon 2 cellules)	+(OPN et embryon 2 cellules)	ND	ND
Salumets <i>et al.</i> , 2003	EC-NEC	FIV et ICSI	25 à 27 H	ND	+	ND	+
Van Montfoort <i>et al.</i> , 2004	EC-NEC	FIV et ICSI	23 à 26 H	+	=	ND	+
Chen et Kattera 2006	2PN, 0PN et stade 2 cellules	FIV et ICSI	26 H	ND	ND	+	+(OPN et embryon 2 cellules)
Hesters et Achour Frydman, 2006	2PN, 0PN et stade 2 cellules	FIV et ICSI	25 à 27 H	ND	+(avec embryon 2 cellules)	ND	+(avec embryon 2 cellules)
Etude Limoges (2003-2006)	2PN, 0PN et stade 2 cellules.	FIV	26 H	ND	ND	ND	+
		ICSI		ND	ND	ND	+

+ : amélioration avec le clivage précoce ; - : diminution avec le clivage précoce ; = : pas de différence entre les groupes ; H : durée en heures ; blastocyste : développement jusqu'au stade de blastocyste ; ND : données non disponibles ; \* deux types de classifications sont possibles : soit classification EC-NEC : early-cleaving versus non early-cleaving (embryon divisé à deux cellules précocement versus un embryon non divisé précocement) soit classification 2PN, 0PN et stade 2 cellules.

Une étude prospective présentée par Hesters et Achour Frydman dans le Journal de Gynécologie Obstétrique et de Biologie de la Reproduction (2006), avait pour but d'étudier l'impact du clivage précoce sur la morphologie des embryons et leur potentiel implantatoire et avait été initiée à l'hôpital Bécclère à Clamart entre février et décembre 2005. Les résultats ont montré une différence significative en faveur du groupe avec les embryons à 2 cellules comparé aux groupes distincts 2PN et 0PN concernant l'incidence d'embryons dits de « top qualité » à J2 (moins de 20% de fragments cellulaires, quatre blastomères réguliers et sans multinucléation). De plus, le taux de grossesses cliniques obtenues après transferts

d'embryons provenant de ces zygotes clivés précocement, est significativement supérieur à celui des embryons provenant de zygotes non clivés précocement.

Dans notre étude, la division précoce à la 26<sup>e</sup> heure est prédictive du taux de grossesses et d'accouchements quelle que soit la technique de FIV utilisée alors que le stade à OPN est prédictif du taux de grossesses seulement (pas du taux d'accouchements) et seulement en FIV classique. Enfin, dans notre travail et dans la plupart des études citées auparavant, deux à trois embryons sont transférés. Aussi, pour une estimation plus rigoureuse du potentiel implantatoire de chaque embryon il sera important d'étudier le lien entre l'aspect à la 26<sup>e</sup> heure et le taux de grossesses à la suite de transfert d'un seul embryon.

Enfin notre étude a montré que la morphologie de l'embryon transféré influence les résultats. La morphologie embryonnaire est selon beaucoup d'auteurs un critère prédictif très important des chances d'implantation. Ainsi le « top » embryon est caractérisé par plusieurs éléments (Van Royen *et al.*, 1999) : embryon à quatre ou cinq blastomères au deuxième jour, sept ou plus de blastomères au troisième jour, moins de 20% de fragments cellulaires, et absence de blastomère multinucléé. Cette étude retrouve un taux d'implantation de 49% s'il s'agit d'un transfert de deux top embryons, un taux de 35% s'il n'y a qu'un seul top embryon sur les deux, et un taux de 12% en l'absence de top embryon. Une étude suédoise (Saldeen *et al.*, 2005) a étudié les taux de grossesses uniques et gémellaires sur trois périodes différentes selon leur politique de transfert (période de double transfert d'embryon n=609 ; période de transition n=320 ; période de transfert unique d'embryon n=433). Cette étude montre que le choix d'embryons top qualité a permis l'application de la nouvelle loi suédoise sur le transfert unique d'embryon (SET) sans altérer le taux de grossesses cliniques (37,4% versus 33,3% durant la période de double transfert d'embryons). Cela s'est accompagné d'une diminution très significative du taux de grossesses gémellaires (6,2% durant la période de transfert d'embryon unique versus 22,6% durant la période de double transfert d'embryons).

Le critère étudié dans notre étude est proche du critère de top embryon : il s'agit d'un embryon ayant une vitesse de clivage correcte (quatre blastomères de taille régulière à J2) et moins de 20% de fragments (I4, II4+). Concernant le taux de grossesses et d'accouchements, ce critère est significatif en ICSI, alors que dans l'étude FIV, ce critère est statistiquement significatif dans l'analyse univariée, mais n'apparaît pas indépendant suite à l'analyse multivariée.

Dans une large étude rétrospective scandinave (Thurin *et al.*, 2005), après analyse univariée et multivariée, ce critère apparaît significatif et indépendant quelle que soit la technique (FIV ou ICSI). D'autres auteurs ont établi des corrélations entre les anomalies de vitesse de clivage et/ou l'existence d'anomalies morphologiques chez l'embryon et son potentiel implantatoire.



Dans une étude française réalisée sur un total de 858 embryons clivés transférés, des taux de grossesses significativement plus élevés sont obtenus avec le transfert d'embryons ne présentant ni irrégularités cellulaires, ni fragmentation (Giorgetti *et al.*, 1995). Cette étude montre aussi un taux d'implantation deux fois plus élevé avec le transfert d'embryons à quatre cellules par rapport à celui d'embryons en comportant plus ou moins. Une autre étude rétrospective rapporte des taux d'implantation et de grossesses (23% et 49% respectivement) plus élevés avec le transfert d'embryons ayant 4 blastomères à J2 par rapport au transfert d'embryons à seulement 2 ou 3 blastomères. Cette étude conclut à la meilleure valeur pronostique du critère « vitesse de clivage » sur le critère « aspect morphologique » (en particulier fragmentation modérée) pour le choix des embryons à transférer (Ziebe *et al.*, 1997).

L'inégalité de taille des blastomères est également un élément à prendre en compte : une étude a montré (par méthode de FISH) qu'un clivage inégal des blastomères était plus souvent associé à des aneuploïdies et des multinucléations (Hardarson *et al.*, 2001). Il a été aussi observé que le transfert d'embryons présentant quatre blastomères de taille inégale à J2 entraîne un taux significativement moins élevé d'implantation et de grossesses que celui d'embryons à quatre blastomères égaux (Hardarson *et al.*, 2001). Ces résultats rejoignent le critère « I4, II4+ » de notre étude puisqu'il implique la régularité de la taille des blastomères.

De même le pourcentage et le type de distribution de fragmentations au sein de l'embryon J2 et J3 influencent significativement les taux de grossesse cliniques et d'implantation : un seuil de 20% de fragments est déterminé par plusieurs auteurs (Alikani *et al.*, 1999 ; Gerris *et al.*, 1999 ; Hardarson *et al.*, 2001) comme une limite supérieure aux possibilités de transfert. Une autre étude montre que le type de fragmentation (taille et distribution des fragments à l'intérieur de l'embryon) joue un rôle important et probablement plus déterminant que le pourcentage global de fragmentation vis-à-vis du potentiel implantatoire (Antczak *et al.*, 1999).

Le statut nucléaire (présence de blastomères multinucléés ou BMN) n'a pas été étudié dans notre analyse (mais c'est un facteur qui influence le choix des embryons à transférer en pratique). De nombreuses études montrent un impact négatif de la présence de BMN sur l'implantation embryonnaire. Ainsi une analyse rétrospective (Van Royen *et al.*, 2003) incluant plus de 10 000 embryons clivés montre que l'incidence de la multinucléation croît avec le taux de fragmentation de l'embryon et qu'elle est associée à un taux réduit d'implantation.

# CHAPITRE 7. RECHERCHE DE CRITERES POUR LE SCORE EMBRYONNAIRE

## 1. INTRODUCTION-BIBLIOGRAPHIE

La qualité embryonnaire est un élément important à apprécier pour améliorer le taux d'implantation et les chances de grossesses.

### 1-1-A. Intérêts d'établir un score embryonnaire

● **Intérêt clinique** : Ce score doit nous aider à choisir le ou les embryons avec le meilleur potentiel implantatoire, permettant d'assurer des chances de grossesses mais aussi d'éviter les grossesses multiples. La politique de transfert d'embryon unique a été développée dans de nombreux pays qui ont établi des recommandations voire des obligations dans le nombre d'embryons à transférer (Coetsier *et al.*, 1998 ; Gerris *et al.*, 1999 ; De Neubourg *et al.*, 2002 ; Gerris *et al.*, 2002 ; De Sutter *et al.*, 2003 ; Tiitinen *et al.*, 2003). Cette stratégie est débattue car il est admis que le nombre d'embryons transférés est étroitement lié au taux de succès. Certains ont montré qu'un taux acceptable de grossesses peut être atteint si un embryon de « top qualité » est disponible pour le transfert (Vilksa *et al.*, 1999). Ainsi le score embryonnaire devrait nous permettre de compléter cette notion de top embryon.

● **Intérêt éthique** : Il permet de donner une information plus précise aux couples au moment du transfert.

● **Intérêt scientifique** : Il permet la standardisation de critères d'évaluation pour comparer les pratiques d'un laboratoire à l'autre et l'amélioration des techniques (milieu de culture, traitement hormonal de stimulation), *etc.*

● **Intérêt statistique** : Le choix des embryons à transférer n'est pas toujours basé sur des preuves médicales et statistiques (evidence based medicine). En pratique dans notre laboratoire, la sélection des embryons à transférer est basée sur des critères décrits dans la littérature. L'importance qu'il faut donner à chaque critère n'est pas toujours bien définie et un outil statistique peut nous aider à les évaluer.

Ainsi, notre étude devrait nous permettre de :

- Faire la preuve statistique du lien entre nos critères et le potentiel implantatoire d'un embryon.
- Déterminer la qualité embryonnaire dans son ensemble (poids de chaque critère)
- Réorganiser, dans un second temps, le travail quotidien de classification et typage des embryons (confirmation ou abandon de certains critères).
- Préciser l'information donnée aux patients par rapport à nos propres statistiques.

### 1-1-B. Établir un score embryonnaire

Dans la littérature, on retrouve plusieurs travaux étudiant le score embryonnaire. C'est le cas notamment dans les pays où la législation ne permet pas la culture de tous les embryons avec des évaluations précoces et la mise en place de score de zygote comme en Suisse (Senn *et al.*, 2006) voir de score ovocytaire en Italie (Wilding *et al.*, 2007). Les difficultés rencontrées lors de la mise en place d'un score qu'il soit ovocytaire, zygotique ou embryonnaire, sont relatives aux nombres d'embryons transférés, aux choix des critères et de la méthode statistique (tableau 7-1).

● **Transfert de plusieurs embryons :** Il peut être difficile d'estimer le potentiel implantatoire d'un embryon dans la mesure où il y a plus d'embryons transférés que d'embryons implantés (Desai *et al.*, 2000 ; Terriou *et al.*, 2001 ; De placido *et al.*, 2002 ; Loi *et al.*, 2008). On ignore alors quel embryon s'est implanté et les critères d'évaluation propres à chaque embryon sont reliés au potentiel implantatoire estimé approximativement. Cela a été contourné par :

- Des scores cumulés d'embryon : score de transfert embryonnaire (Terriou *et al.*, 1996), score cumulatif embryonnaire (Terriou *et al.*, 2001) score cumulé au stade des *pronuclei* dans l'étude de Senn *et al.* (2006), score cumulatif embryonnaire (Loi *et al.*, 2008).
- Des transferts avec des embryons de score équivalent (Ziebe *et al.*, 1997).
- Des transferts d'embryon unique (Giorgetti *et al.*, 1995 ; Salumets *et al.*, 2001).
- Transferts d'un ou de plusieurs embryons avec 0% et 100% d'implantation (Van Royen *et al.*, 2001 ; Holtes *et al.*, 2007).

● **Le choix des critères** (tableau 7-1)

- Selon la revue de la littérature (Desai *et al.*, 2000 ; De placido *et al.*, 2002 ; Senn *et al.*, 2006 ; Sjöblom *et al.*, 2006 ; Holte *et al.*, 2007 ; Wilding *et al.*, 2007 ; Loi *et al.*, 2008).
- Selon les habitudes du laboratoire et la facilité de mise en place de l'observation de ces nouveaux critères au sein de l'organisation du laboratoire (Loi *et al.*, 2008) et sans besoin de nouveau matériel (Wilding *et al.*, 2007).
- Beaucoup de critères sont parfois pris en compte, par exemple six items dans l'étude de De placido *et al.* (2002) ou de Senn *et al.* (2006) voire dix dans l'étude de Sjöblom *et al.* (2006).

De multiples critères ont été proposés au sein de scores prédictifs du taux d'implantation :

- Des critères ovocytaires comme la granularité et la présence de vacuoles et d'inclusions cytoplasmiques (Wilding *et al.*, 2007), l'épaisseur de la zone pellucide (Sjöblom *et al.*, 2006) ;
- La polarisation des précurseurs nucléolaires, le centrage des *pronuclei*, la présence d'un halo cytoplasmique (Senn *et al.*, 2006) ;
- Le clivage précoce à la 26<sup>e</sup> heure (Giorgetti *et al.*, 1995 ; Ziebe *et al.*, 1997 ; Terriou *et al.*, 2001) ;
- L'aspect de l'espace périvitellin (Sjöblom *et al.*, 2006) ;
- La distribution des fragments cytoplasmiques (Desai *et al.*, 2000) ;
- Le taux de fragments cytoplasmiques au sein de l'embryon (Giorgetti *et al.*, 1995 ; Ziebe *et al.*, 1997 ; Van Royen *et al.*, 2001 ; Holte *et al.*, 2007 ; Loi *et al.*, 2008) ;
- L'absence de blastomères multinucléés (Ziebe *et al.*, 1997 ; Van Royen *et al.*, 2001) ;
- La présence de vacuoles et d'inclusions cytoplasmiques (Desai *et al.*, 2000)
- Le nombre de blastomères (Terriou *et al.*, 2001 ; Holte *et al.*, 2007 ; Loi *et al.*, 2008)
- L'uniformité de la taille des blastomères (Giorgetti *et al.*, 1995 ; Ziebe *et al.*, 1997 ; Terriou *et al.*, 2001 ; De placido *et al.*, 2002 ; Fisch *et al.*, 2001 ; Sjöblom *et al.*, 2006 ; Holte *et al.*, 2007 ; Loi *et al.*, 2008) ;
- La symétrie du clivage (Holte *et al.*, 2007) ;
- Le stade d'expansion du blastocyste (Gardner *et al.*, 2004) ;

● **Choix du type d'étude** (tableau 7-1)

○ L'étude menée par Fisch *et al.* (2001) présente un score embryonnaire prédictif de la formation de blastocyste et de l'implantation (graduated embryo scoring GES). Ce score a été étudié de façon rétrospective sur 109 patientes. À chaque critère d'évaluation (alignement des *pronuclei*, régularité du clivage à la 26<sup>e</sup> heure, taux de fragmentation et nombre de blastomères) était attribuée une valeur selon l'importance du critère (littérature, habitude du laboratoire). Cette étude a montré que les scores >70 ont des meilleurs taux de formation de blastocystes et de meilleurs taux d'implantation. Enfin, ce score s'est montré plus discriminant que les critères isolés (morphologie à J3 ou clivage précoce à la 26<sup>e</sup> heure). Puis une seconde étude a évalué

ce score de manière prospective (Fisch *et al.*, 2003) et a confirmé son efficacité pour de meilleurs taux de grossesses et d'implantation.

- La mise en place d'un score est différente dans l'étude menée par Holtes *et al.* (2007). Dans un premier temps, les critères ont été étudiés dans une population où l'implantation de l'embryon est certaine : transfert de deux embryons et grossesse de jumeaux (n= 228) ou absence de grossesse (n=1385). La significativité de chaque critère a été étudiée dans une analyse univariée puis par régression logistique. Sur cinq critères initialement étudiés (taux de fragmentation, blastomères multinucléés, symétrie du clivage, nombre et égalité de la taille des blastomères), seul les critères indépendants et statistiquement lié à l'implantation ont permis de construire un score embryonnaire IMC (integrated morphology cleavage). La valeur prédictive positive de chaque critère (nombre et homogénéité de taille des blastomères, multinucléation) a été calculée afin de lui attribuer une valeur plus ou moins importante dans le score. Puis le score a été validé statistiquement dans la population intermédiaire c'est-à-dire les transferts de deux embryons ayant abouti à des grossesses uniques (n=653). En conclusion, cette étude a montré que ce modèle de score embryonnaire (intégrant les critères de nombre et d'égalité de taille des blastomères et la présence ou non de blastomères multinucléés) peut améliorer la sélection des embryons à transférer au deuxième jour.

Tableau 7-1. Tableau récapitulatif des scores dans la littérature

Référence de l'étude	Nom du score	Type d'étude	critères	Nombre de transferts	Nombre d'embryons	Nombre moyen d'embryons	R <sup>2</sup>
Giorgetti <i>et al.</i> , 1995	Score embryonnaire	rétrospective	Embryon segmenté, taux de fragmentation, régularité et nombre de blastomères	957	957	1	ND
Terriou <i>et al.</i> , 1996	Score de transfert embryonnaire (SET)	prospective	Embryon segmenté, taux de fragmentation, régularité et nombre de blastomères	1079	2755	2,6	ND
Ziebe <i>et al.</i> , 1997	-	rétrospective	Clivage précoce à la 26 <sup>e</sup> heure et morphologie de l'embryon*	1001	1918 <sup>(a)</sup>	1,9	ND
Desai <i>et al.</i> , 2000	Day embryo quality (D3EQ)	rétrospective	Régularité et nombre de blastomères, vacuoles et inclusions cytoplasmiques, distribution des fragments cytoplasmiques	93	316	3,4	ND
Gardner <i>et al.</i> , 2004	Score d'évaluation du blastocyste	prospective	Taille du blastocèle, formation du bouton embryonnaire et du trophoctoderme	48	48 <sup>(b)</sup>	1	ND
Fisch <i>et al.</i> , 2001	Graduated embryo score (GES)	rétrospective	Alignement des nucléoles sur l'axe des <i>pronuclei</i> , clivage et fragmentation à la 26e heure, nombre de cellules et morphologie de l'embryon*	109	294	2,7	ND
Terriou <i>et al.</i> , 2001	Cumulative embryo score (CES)	rétrospective	Embryon segmenté, taux de fragmentation, régularité et nombre de blastomères	10 000	> 30 000	3,1	ND
Van Royen <i>et al.</i> , 2001	-	rétrospective	Pourcentage de fragmentation, nombre et multinucléation des blastomères	125	213	1,7	ND
De placido <i>et al.</i> , 2002	Score embryonnaire	rétrospective	Critères du zygote (position des pronucléi et des précurseurs nucléolaires, aspect du cytoplasme) et critère de morphologie de l'embryon*	154	551	3,6	ND
Fisch <i>et al.</i> , 2003	Graduated embryo score (GES)	prospective	Alignement des nucléoles sur l'axe des <i>pronuclei</i> , clivage et fragmentation à la 26e heure, nombre de cellules et morphologie au 3 <sup>ème</sup> jour	106	313	2,7	ND
Senn <i>et al.</i> , 2006	Cumulated pronuclear score (CPNS)	rétrospective	Rapprochement, orientation et centrage des pronucléi, halo cytoplasmique, polarisation et nombre des précurseurs nucléolaires.	304	613	2,02	ND
Sjöblom <i>et al.</i> , 2006	Embryo scoring system	rétrospective	Critères de l'ovocyte (membrane, cytoplasme, globule polaire, <i>etc.</i> ), du zygote ( <i>pronucléi</i> , nucléoles, zone pellucide), de l'embryon à J2 ou J3( taille et forme des blastomères, espace périvitellin, fragmentation)	340	724	2,1	0,92
Holtes <i>et al.</i> , 2007	integrated morphology cleavage (IMC)	rétrospective	taux de fragmentation, blastomères multinucléés, symétrie du clivage, nombre et égalité de la taille des blastomères	1613	2770 <sup>(c)</sup> et 456 <sup>(d)</sup>	2	ND
Wilding <i>et al.</i> , 2007	Score ovocytaire	prospective	Granularité de l'ovocyte, inclusions et vacuoles, qualité de la micro-injection	822	2017 <sup>(a)</sup>	2,4	ND
Loi <i>et al.</i> , 2008	Cumulative embryo scoring system (CES)	rétrospective	morphologie de l'embryon*	364	992	3	ND

ND : non déterminé ; \* : taux de fragments cytoplasmiques, blastomères multinucléés, nombre et uniformité de taille des blastomères ; (a) : de score équivalent ; (b) embryon transférés au stade de blastocyste ; (c) : 0% d'implantation ; (d) :100% d'implantation ; R<sup>2</sup> : coefficient de détermination.

## 2. MATÉRIELS ET METHODE

### 2-1. Schéma d'étude

Dans notre travail, sur 1052 transferts entre 2003 à 2006, 826 ont pu être étudiés rétrospectivement pour le score embryonnaire. Les transferts étudiés sont ceux dont le taux d'implantation était égal à 0 ou à 100%, les autres transferts n'ont pas été pris en compte.

### 2-2. Population étudiée

La cohorte étudiée comprenait 1444 embryons issus de 826 tentatives en FIV classique (475 transferts et 818 embryons) et des ICSI (351 transferts et 626 embryons). L'âge moyen des femmes était de 33,2±4,5 ans.

Tableau 7-2. Répartition des différentes variables des embryons étudiés

Technique	Embryons transférés
FIV classique	818 (57%)
FIV avec ICSI	626 (43%)
<b>Jour de transfert</b>	
J2	787 (55%)
J3	654 (45%)
<b>Classification à J1</b>	
Type Z1-Z2	840 (58%)
Autres types	604 (42%)
<b>Classifications à H26</b>	
2PN	568 (39%)
0PN	314 (22%)
Embryons à 2 cellules	320 (22%)
Non typés	242 (17%)
<b>Classification à J2</b>	
Type I4, II4+	714 (49%)
Autres types	730 (51%)

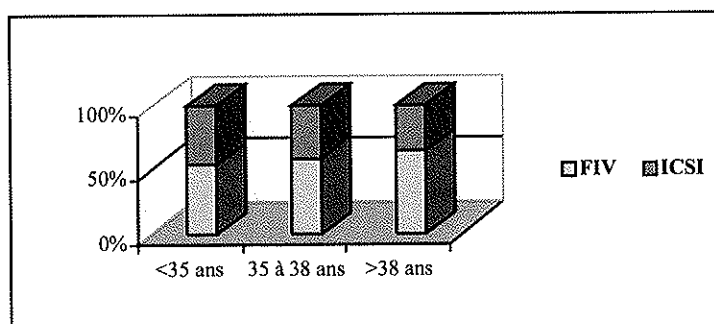


Figure 7-1. Répartition des différentes techniques

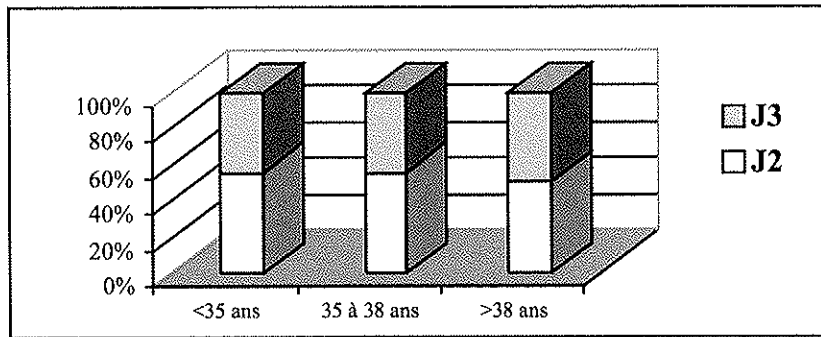


Figure 7-2. Répartition des différents jours de transfert

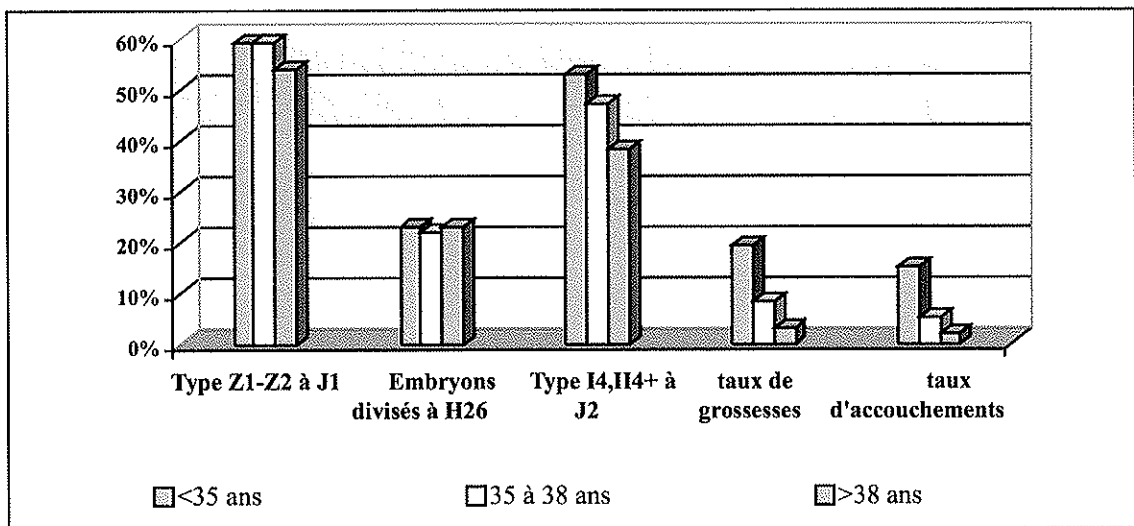


Figure 7-3. Les critères du score, les taux de grossesses et d'accouchements en fonction de l'âge des patientes

### 2-3. Le déroulement d'une tentative

Les étapes sont identiques aux étapes décrites dans le chapitre 6.

### 2-4. La base de donnée

La base de données a été constituée de manière rétrospective sur fichier Excel à partir des feuilles de travail du laboratoire. Les critères de chaque embryon inclus et le devenir de cet embryon ont été analysés de manière à dégager un score embryonnaire.

#### • Les critères d'inclusion des embryons

Il s'agissait des transferts d'embryon unique implanté ou non. Il a été aussi inclus les transferts de deux embryons ayant abouti à une implantation de deux embryons ou non ainsi que les transferts de trois embryons ayant abouti à l'implantation de trois embryons ou non.



Les transferts d'embryons multiples n'ayant abouti qu'à une grossesse unique n'ont pas été inclus, de même que les transferts d'embryon après culture prolongée (blastocyste).

Tableau 7-3. Distribution des différents types de transferts (unique, double ou triple)

Nombre d'embryons transférés	Nombre de transferts	Nombre d'embryons implantés	Nombre d'accouchements
1	231	40	31
2	551	161	120
3	37	0	0

• **Les critères d'évaluation de l'embryon** ont été choisis en fonction des résultats de l'analyse précédente et de la littérature. La variable dépendante « accouchement » a été étudié statistiquement en fonction de :

- L'âge de la femme ;
- L'évaluation à J1 : Zygote de type Z1 ou Z2;
- L'évaluation à la 26<sup>e</sup> heure : *pronuclei* visibles (2PN), disparition des *pronuclei* (0PN), division précoce (embryon à deux cellules) ;
- L'évaluation à J2 : embryon de type I4, II4+ ;
- Le jour du transfert : J2 (2<sup>e</sup>) ou J3 (3<sup>e</sup> jour).

## 2-5. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SAS (version 9.2). Une analyse univariante des données a d'abord été réalisée afin de mettre en évidence les facteurs prédictifs grâce au coefficient de corrélation de Pearson ou test de  $\chi^2$  (ou test exact de Fisher en fonction des effectifs théoriques), et test t de Student. À partir de ces résultats, une analyse multivariante par régression linéaire multiple ou régression logistique (en fonction du type de la variable dépendante) a été réalisée pour chaque variable dépendante afin de mettre en évidence les variables statistiquement significatives et indépendantes. Chaque modèle initial a inclus les variables significatives et celles dont le degré de significativité était inférieur à 0,2000. Le modèle a ensuite été simplifié en pas à pas descendant, jusqu'au modèle final. Pour la régression logistique, des odds ratio ont été estimés ainsi que leurs intervalles de confiance à 95% par méthode exacte. Le seuil de significativité retenu pour l'ensemble des analyses est de 0,0500.

### 3. RÉSULTATS

L'analyse univariée des critères du score en fonction de la variable accouchement a montré qu'il existe une différence significative ( $p < 0,0500$ ) avec l'ensemble des variables quantitatives suivantes:

- L'âge de la femme ;
- Le jour de transfert J3 ;
- Les embryons de type I4, II4+ à J2.

Tableau 7-4. Résultats de l'analyse univariée de l'accouchement

Variables indépendantes	p
Age Femme	<0,0001*
<b>Classification à J1</b>	
Type Z1-Z2	0,1500
<b>Classifications à H26</b>	
2PN	0,3400
0PN	0,2900
Embryons à 2 cellules	0,1550
<b>Classification à J2</b>	
Type I4, II4+	<0,0001*
Jour du transfert J3	0,0140*

\* : p significatif (<0,0500)

L'analyse multivariée des critères du score en fonction de la variable accouchement a ensuite étudié ces variables significatives dans un modèle de régression logistique. Au final, les critères suivants sont liés de manière significative et indépendante à la variable accouchement :

- L'âge de la femme : une année supplémentaire diminue le taux d'accouchements de 0,87 (odds ratio = 0,87 ; Intervalle de confiance à 95% = 0,84-0,91).
- Alors que les deux variables ci-dessous augmentent les chances d'accouchements :
- Le nombre d'embryons de type I4, II4+ ;
  - Le jour du transfert J3.

Cependant, le «  $R^2$  » de la régression logistique est faible (0,091). Statistiquement, cela signifie que ces éléments n'expliquent que 10% de la probabilité de survenue d'un accouchement.

Tableau 7-5. Résultats de l'analyse multivariée de la variable accouchement

Variables indépendantes	Odds Ratio	Intervalle de confiance à	p
		95%	
Age Femme	0,87	0,84-0,91	<0,0001*
Type I4, II4+	2,65	1,81-3,87	<0,0001*
Jour du transfert J3	1,67	1,17-2,38	0,045*
$R^2 = 0,091$			

\* : p significatif (<0,0500) ;  $R^2$  : coefficient de détermination de la régression logistique

#### 4. DISCUSSION

Le critère « âge de la femme » est prédictif de l'accouchement dans nos deux études et retrouvé dans la littérature (Templeton *et al.*, 1996 ; Thurin *et al.*, 2005). Plus l'âge de la femme augmente, moins l'embryon a de chances de s'implanter et d'aboutir à la naissance d'un enfant (figure 7-3). Dans certaines études, les auteurs s'affranchissent du problème de l'âge des patientes en étudiant le score embryonnaire dans un premier temps sur une population de référence, par exemple âgée de moins de 38 ans (Terriou *et al.*, 1996).

Dans notre population, les taux de grossesses et d'accouchements sont d'autant plus faibles que l'âge augmente. Il n'y a pas de différence selon l'âge dans la distribution des types de techniques (figure 7-1), des jours de transferts (figure 7-2), des proportions des embryons issus de zygotes de types Z1-Z2 et des embryons divisés à la 26<sup>e</sup> heure (figure 7-3).

Il semble que la proportion des embryons de type I4, II4+ diminue avec l'âge mais selon l'analyse multivariée ces deux variables sont statistiquement indépendantes.

Giorgetti *et al.* (1995) montrent des taux de grossesses plus faibles chez les femmes de plus de 38 ans, et ce, malgré le transfert d'embryons de qualité équivalente. Cette étude rapporte des taux de grossesses et d'accouchements corrélés à un score embryonnaire dont les critères sont les suivants : stade de clivage, régularité des blastomères, pourcentage de fragmentation.

Le critère « embryon de type I4, II4+ » est aussi un critère prédictif de l'accouchement retrouvé dans nos deux études et dans la littérature. La morphologie embryonnaire de type I4, II4+ est un critère prédictif très important des chances d'implantation et c'est l'une des caractéristique du « top embryon » (Van Royen *et al.*, 1999). Le transfert d'embryons à quatre blastomères réguliers au deuxième jour augmente le taux d'implantation (Giorgetti *et al.*, 1995 ; Hardarson *et al.*, 2001 ; Saldeen *et al.*, 2005 ; Thurin *et al.*, 2005). Le seuil de 20% de fragments est déterminé par plusieurs auteurs (Alikani *et al.*, 1999 ; Gerris *et al.*, 1999 ; Hardarson *et al.*, 2001).

Alors que l'analyse descriptive n'a pas mis en évidence de différence significative entre les jours de transfert, l'étude du score embryonnaire met en évidence qu'un transfert au troisième jour augmente les chances d'accouchement. Cela a été cité dans la littérature comme un facteur susceptible d'augmenter les taux de grossesses (Van Os *et al.*, 1989) et d'implantation (Carrillo *et al.*, 1998). Reporter le transfert de l'embryon au troisième jour nous permet d'affiner la sélection de l'embryon en accumulant des critères d'évaluations supplémentaires (sept ou plus de blastomères au troisième jour, moins de 20% de fragments cellulaires, sans blastomère multinucléé) ou éviter celui dont la segmentation s'arrêtera entre le deuxième et le troisième jour.

Une synthèse de la littérature menée par Oatway *et al.*, (Cochrane database of systematic reviews, 2004) a étudié les résultats d'essais comparant les transferts à J2 ou à J3 après FIV classique ou ICSI (total de 2027 femmes réparties dans 10 études). Le taux de grossesses semblait être plus important avec les transferts à J3 comparés aux transferts à J2 (odds ratio = 1,26 ; Intervalle de confiance à 95% = 1,06-1,51) mais la preuve statistique n'était pas mise en évidence pour le taux d'accouchements (odds ratio = 1,07; Intervalle de confiance à 95% = 0,84-1,37).

Notre étude ne montre ici aucun lien statistique entre l'accouchement et le critère «division précoce à la 26<sup>e</sup> heure ». Cependant ce critère a été mis en évidence dans l'analyse descriptive précédente et il est bien décrit dans la littérature comme un facteur susceptible d'augmenter le taux de grossesses (Salumets *et al.*, 2003 ; Van Montfoort *et al.*, 2004) et le taux d'accouchement (Lundin *et al.*, 2001 ; Van Montfoort *et al.*, 2004).

Il faut souligner que nos deux études sont différentes : la population de la première étude comprend les tentatives dans leur ensemble alors que la deuxième n'étudie que les embryons individuellement. Par ailleurs, ce critère comptait un certain nombre de valeurs manquantes pour des raisons techniques (n=242) qui peuvent en partie expliquer ce manque de preuve statistique.

En plus du nombre important de valeurs manquantes (20 ayant abouti à un accouchement), il faut remarquer que la méthode statistique a consisté à n'inclure que les transferts avec un taux d'implantation égal à 0 ou à 100% et les transferts avec des taux d'implantation intermédiaires ont été exclus. Un certain nombre de grossesses n'ont donc pas été prises en compte ce qui explique que les taux de grossesses et d'accouchements soient plus faibles que dans l'analyse descriptive précédente (respectivement proche de 30% et de 26% alors qu'ils sont ici de 14% et 10%).

Notre étude ne montre pas de corrélations significatives entre Z1-Z2 et le taux d'accouchements de même que l'analyse descriptive précédente. Certaines études publiées montrent un lien statistique entre le Z-score et le taux d'accouchements (Scott *et al.*, 1998), d'autres ne montrent pas de différences en termes de taux d'accouchements selon le Z-score (James *et al.*, 2006 ; Nicoli *et al.*, 2007).

Le «  $R^2$  », ou coefficient de détermination de la régression logistique est très faible (0,091) alors que globalement un  $R^2$  est acceptable d'un point de vue statistique s'il est supérieur à 0,5. Cette valeur signifie que dans notre étude, seul 10% de la variable dépendante « accouchement » est expliqué par les variables du modèle.

Ces résultats ne sont pas suffisants pour faire un score car celui-ci ne serait pas validé et la courbe ROC issue du score et prédisant la variable dépendante « accouchement » serait mauvaise. La construction du score à partir des valeurs prédictives positives de chaque critère significatif (l'âge de la femme, l'embryon de type I4, II4+, et le jour de transfert) n'est donc pas possible à partir des données de cette étude.

Cela peut s'expliquer de deux façons: La première explication est que d'autres variables n'ont pas été prises en comptes. Ces facteurs peuvent concerner l'embryon comme par exemple le type de fragments dans l'embryon (Desai *et al.*, 2000) ou l'absence de blastomère multinucléé (Ziebe *et al.*, 1997 ; Van Royen *et al.*, 2001). En plus de l'âge de la patiente, d'autres facteurs féminins peuvent sans doute aussi avoir un rôle dans l'implantation et l'accouchement.

La seconde explication est la variation naturelle (hasard ou variation biologique) que les variables indépendantes subissent.

Bien que le coefficient de détermination soit important pour valider statistiquement un score, on ne le retrouve que rarement mentionné dans la littérature (Sjöblom *et al.*, 2006) et l'on peut remettre en cause la fiabilité de certains scores qui paraissent statistiquement bien construits de prime abord mais dont le  $R^2$  n'est pas précisé.

Au final, cette dernière étude n'apporte pas les résultats escomptés. La valeur du «  $R^2$  » nécessaire pour construire un score embryonnaire de façon statistique dépend du choix des variables indépendantes et du problème étudié. Les chances de grossesses et d'accouchements sont sans doute liées à plus de facteurs que ceux étudiés ici. Quels que soient les critères inclus dans un nouveau score embryonnaire, une nouvelle étude prospective devra être menée afin de le valider statistiquement.

## CONCLUSION

Grâce à la quantité importante de données et de paramètres étudiés, notre travail a permis de faire le point sur nos pratiques au laboratoire d'AMP du CHU de Limoges. Certaines vont sans doute être abandonnées comme l'évaluation au premier jour du Z-score qui n'est pas discriminante dans notre étude et relativement controversée dans la littérature. Cette évaluation est sujette à variations entre observateurs et est chronophage. L'évaluation de la survie des spermatozoïdes ne semble elle aussi pas indispensable, et ne sera peut-être pas poursuivie. C'est aussi le cas de la spermoculture qui sera faite dans un contexte évocateur le jour du prélèvement (en cas de leucospermie) ou le lendemain *a posteriori* en cas de contamination des milieux de culture. Diminuer ces analyses inutiles permettra d'optimiser la charge de travail et de réaliser des économies non négligeables de dépenses de santé.

Notre travail souligne l'intérêt de continuer l'évaluation de la qualité morphologique des embryons au deuxième jour et l'évaluation du clivage précoce à la 26<sup>e</sup> heure. Concernant le temps de co-incubation raccourci à trois heures, notre travail a montré qu'il est susceptible d'améliorer le taux de fécondation. Compte tenu de la réorganisation au niveau du laboratoire que demande ce changement de bain raccourci, une étude complémentaire sera réalisée avec deux groupes comparables (âge de la femme et qualité du sperme) pour démontrer ou non un réel bénéfice en termes de taux de fécondation, de taux de polyspermie, de qualité embryonnaire, de taux d'implantation et de taux de grossesses.

Notre deuxième étude a montré que le transfert au troisième jour donne de meilleurs taux d'accouchements. La tendance actuelle est de reporter au troisième jour le transfert pour faciliter le choix du ou des embryons à transférer et en 2008 la répartition des jours de transferts (J2 ou J3) est équilibrée (annexe 3).

Concernant le score embryonnaire, notre étude est décevante car elle n'a pas abouti. Il faudra réfléchir à l'inclusion d'autres critères pour les transferts 2007 et 2008, comme le rang de ponction, la dose de FSH de départ et la présence d'embryons avec des blastomères multinucléés.

Notre travail a le mérite de servir de référence pour lui comparer nos résultats de 2007 et 2008. En effet, depuis le début de l'année 2007, notre laboratoire est installé dans les nouveaux locaux de l'Hôpital de la mère et de l'enfant et le nombre de ponctions annuelles a augmenté. Depuis 2007, certains paramètres comme les taux de grossesses, semblent différents de ceux de 2003 à 2006 (lorsque le laboratoire était situé au CHU Dupuytren). D'autres laboratoires d'AMP ont d'ailleurs rencontré des difficultés suite à des changements de locaux et une future étude consistera donc à objectiver ces variations de résultats et à essayer d'en rechercher les causes.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Agence de Biomédecine. **Bilan des activités de procréation et génétique humaines en France en 2006.**

Site de l'agence de biomédecine : <http://www.agence-biomedecine.fr/> .

Le guide de l'assistance médicale à la procréation : <http://www.procreationmedicale.fr/> .

Le rapport annuel 2006 : <http://www.agence-biomedecine.fr/article/111> .

2. Alikani M., Cohen J., Tomkin G., *et al.* **Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation.** Fertil Steril 1999; 71: 836-42.

3. Antczak M. and 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: 429-47.

4. Balaban B., Urman B., Isiklar A., *et al.* **The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome.** Hum Reprod 2001; 16: 2357-61.

5. Barraud-Lange V., Sifer C., Pocate K., *et al.* **Short gamete co-incubation during in vitro fertilization decreases the fertilization rate and does not improve embryo quality: a prospective auto controlled study.** J Assist Reprod Genet 2008; 25: 305-10.

6. Boivin J., Bunting L., Collins J. A., *et al.* **International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care.** Hum Reprod 2007; 22: 1506-12.

7. Bos-Mikich A., Mattos A. L. and Ferrari A. N. **Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome.** Hum Reprod 2001; 16: 2658-61.

8. Bukulmez O., Yarali H., Yucel A., *et al.* **Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro fertilization for patients with a tubal factor as their sole cause of infertility: a prospective, randomized trial.** Fertil Steril 2000; 73: 38-42.

9. Carrillo A. J., Lane B., Pridman D. D., *et al.* **Improved clinical outcomes for in vitro fertilization with delay of embryo transfer from 48 to 72 hours after oocyte retrieval: use of glucose- and phosphate-free media.** *Fertil Steril* 1998; 69: 329-34.
10. Chen C. and Kattera S. **Comparison of pronuclear zygote morphology and early cleavage status of zygotes as additional criteria in the selection of day 3 embryos: a randomized study.** *Fertil Steril* 2006; 85: 347-52.
11. Coetsier T. and Dhont M. **Avoiding multiple pregnancies in in-vitro fertilization: who's afraid of single embryo transfer?** *Hum Reprod* 1998; 13: 2663-4.
12. Coskun S., Roca G. L., Elnour A. M., *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: 605-8.
13. Czyba J.C. et Montella, A. **Biologie de la reproduction humaine** Montpellier, Sauramps médical, 1993, 305p.
14. Daya S. **Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles.** *Cochrane Database Syst Rev* 2000: CD001299.
15. De Neubourg D., Mangelschots K., Van Royen E., *et al.* **Impact of patients' choice for single embryo transfer of a top quality embryo versus double embryo transfer in the first IVF/ICSI cycle.** *Hum Reprod* 2002; 17: 2621-5.
16. De Neubourg D., Gerris J., Mangelschots K., *et al.* **Single top quality embryo transfer as a model for prediction of early pregnancy outcome.** *Hum Reprod* 2004; 19: 1476-9.
17. De Placido G., Wilding M., Strina I., *et al.* **High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate.** *Hum Reprod* 2002; 17: 2402-9.
18. De Sutter P., Van der Elst J., Coetsier T., *et al.* **Single embryo transfer and multiple pregnancy rate reduction in IVF/ICSI: a 5-year appraisal.** *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 464-9.



19. Desai N. N., Goldstein J., Rowland D. Y., *et al.* **Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study.** Hum Reprod 2000; 15: 2190-6.
20. 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: 2562-4.
21. Drews U. **Atlas de poche d'embryologie.** Medecine-Science Flammarion 1994; Paris.
22. Dunson D. B., Baird D. D. and Colombo B. **Increased infertility with age in men and women.** Obstet Gynecol 2004; 103: 51-6.
23. Fédération de biologistes des laboratoires d'étude de la fécondation et de la conservation des oeufs (BLEFCO). <http://www.procreanet.com/pub/brochures/fiv/>.
24. Fenwick J., Platteau P., Murdoch A. P., *et al.* **Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro.** Hum Reprod 2002; 17: 407-12.
25. Fisch J. D., Rodriguez H., Ross R., *et al.* **The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos.** Hum Reprod 2001; 16: 1970-5.
26. Fisch J. D., Sher G., Adamowicz M., *et al.* **The graduated embryo score predicts the outcome of assisted reproductive technologies better than a single day 3 evaluation and achieves results associated with blastocyst transfer from day 3 embryo transfer.** Fertil Steril 2003; 80: 1352-8.
27. **FIVNAT Dossier FIVNAT 2000-2004**  
Paris, FIVNAT, 2006.
28. Flaherty S. P., Payne D. and Matthews C. D. **Fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection.** Hum Reprod 1998; 13 Suppl 1: 155-64.

29. Gardner D. K. and Schoolcraft W. B. **Culture and transfer of human blastocysts.** *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999; 11: 307-11.
30. Gardner D. K., Surrey E., Minjarez D., *et al.* **Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial.** *Fertil Steril* 2004; 81: 551-5.
31. Genévrier Biotechnologies . **Brochure d'information et site internet:**  
<http://www.laboratoires-genevrier.com/fr/laboratoire/votre-sante/>.
32. Gerris J., De Neubourg D., Mangelschots K., *et al.* **Prevention of twin pregnancy after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial.** *Hum Reprod* 1999; 14: 2581-7.
33. Gerris J., De Neubourg D., Mangelschots K., *et al.* **Elective single day 3 embryo transfer halves the twinning rate without decrease in the ongoing pregnancy rate of an IVF/ICSI programme.** *Hum Reprod* 2002; 17: 2626-31.
34. Gianaroli L., Cristina Magli M., Ferraretti A. P., *et al.* **Reducing the time of sperm-oocyte interaction in human in-vitro fertilization improves the implantation rate.** *Hum Reprod* 1996; 11: 166-71.
35. Giorgetti C., Terriou P., Auquier P., *et al.* **Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers.** *Hum Reprod* 1995; 10: 2427-31.
36. 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: 313-8.
37. Hassan M. A. and Killick S. R. **Effect of male age on fertility: evidence for the decline in male fertility with increasing age.** *Fertil Steril* 2003; 79 Suppl 3: 1520-7.
38. Hedon B., Benos P., Dechaud H., *et al.* **Agoniste de la GnRh en gynécologie.** Edition techniques. EMC (Encyclopédie médico-chirurgicale) gynécologie 1995 (mise à jour); 85-A-30, 8p.

39. Hesters L. et Frydman A. **Early cleavage : impact on embryo quality and implantation potential.** Journal de gynécologie obstétrique et de biologie et de la reproduction 2007; 36: S17-S21.
40. Holte J., Berglund L., Milton K., *et al.* **Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval.** Hum Reprod 2007; 22: 548-57.
41. Humeau C. et Arnal F. **Reproduction et développement**  
Montpellier, Sauramps médical, 2005, 312p.
42. James A. N., Hennessy S., Reggio B., *et al.* **The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes.** Hum Reprod 2006; 21: 1599-604.
43. Janny L. and Menezo Y. J. **Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation.** Mol Reprod Dev 1996; 45: 31-7.
44. Kattera S. and Chen C. **Short coincubation of gametes in in vitro fertilization improves implantation and pregnancy rates: a prospective, randomized, controlled study.** Fertil Steril 2003; 80: 1017-21.
45. Lan K. C., Huang F. J., Lin Y. C., *et al.* **The predictive value of using a combined Z-score and day 3 embryo morphology score in the assessment of embryo survival on day 5.** Hum Reprod 2003; 18: 1299-306.
46. Lansac J. et Guérif F. **L'assistance médicale à la procréation en pratique.**  
Paris, Masson, 2005, 602p.
47. Loi K., Prasath E. B., Huang Z. W., *et al.* **A cumulative embryo scoring system for the prediction of pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection.** Singapore Med J 2008; 49: 221-7.
48. Lundin K., Bergh C. and Hardarson T. **Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF.** Hum Reprod 2001; 16: 2652-7.

49. Lundqvist M., Johansson U., Lundkvist O., *et al.* **Reducing the time of co-incubation of gametes in human in-vitro fertilization has no beneficial effects.** *Reprod Biomed Online* 2001; 3: 21-24.
50. Melie N. A., Adeniyi O. A., Igbineweka O. M., *et al.* **Predictive value of the number of oocytes retrieved at ultrasound-directed follicular aspiration with regard to fertilization rates and pregnancy outcome in intracytoplasmic sperm injection treatment cycles.** *Fertil Steril* 2003; 80: 1376-9.
51. Menezo Y. and Barak Y. **Comparison between day-2 embryos obtained either from ICSI or resulting from short insemination IVF: influence of maternal age.** *Hum Reprod* 2000; 15: 1776-80.
52. Montag M. and van der Ven H. **Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study.** *Hum Reprod* 2001; 16: 2384-9.
53. Neuber E., Rinaudo P., Trimarchi J. R., *et al.* **Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development.** *Hum Reprod* 2003; 18: 1307-12.
54. Nicoli A., Valli B., Di Girolamo R., *et al.* **Limited importance of pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) in assisted reproduction outcome in the absence of embryo cryopreservation.** *Fertil Steril* 2007; 88: 1167-73.
55. Nygren K. G. and Andersen A. N. **Assisted reproductive technology in Europe, 1999. Results generated from European registers by ESHRE.** *Hum Reprod* 2002; 17: 3260-74.
56. Oatway C., Gunby J. and Daya S. **Day three versus day two embryo transfer following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection.** *Cochrane Database Syst Rev* 2004: CD004378.
57. Palermo G., Joris H., Devroey P., *et al.* **Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte.** *Lancet* 1992; 340: 17-8.

58. Ruiz A., Remohi J., Minguez Y., *et al.* **The role of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexplained infertility after failed intrauterine insemination.** *Fertil Steril* 1997; 68: 171-3.
59. Sakkas D., Shoukir Y., Chardonnens D., *et al.* **Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability.** *Hum Reprod* 1998; 13: 182-7.
60. Sakkas D., Percival G., D'Arcy Y., *et al.* **Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection.** *Fertil Steril* 2001; 76: 1150-6.
61. Saldeen P. and Sundstrom P. **Would legislation imposing single embryo transfer be a feasible way to reduce the rate of multiple pregnancies after IVF treatment?** *Hum Reprod* 2005; 20: 4-8.
62. Salumets A., Hyden-Granskog C., Suikkari A. M., *et al.* **The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality.** *Hum Reprod* 2001; 16: 2177-81.
63. Salumets A., Hyden-Granskog C., Makinen S., *et al.* **Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures.** *Hum Reprod* 2003; 18: 821-5.
64. Scott L. A. and Smith S. **The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval.** *Hum Reprod* 1998; 13: 1003-13.
65. 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: 2394-403.
66. Scott L., Finn A., O'Leary T., *et al.* **Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates.** *Hum Reprod* 2007; 22: 230-40.

67. Senn A., Urner F., Chanson A., *et al.* **Morphological scoring of human pronuclear zygotes for prediction of pregnancy outcome.** Hum Reprod 2006; 21: 234-9.
68. Shapiro B. S., Richter K. S., Harris D. C., *et al.* **Influence of patient age on the growth and transfer of blastocyst-stage embryos.** Fertil Steril 2002; 77: 700-5.
69. Sjoblom P., Menezes J., Cummins L., *et al.* **Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics.** Fertil Steril 2006; 86: 848-61.
70. Spira A. **Epidemiology of human reproduction.** Hum Reprod 1986; 1: 111-5.
71. Swenson K., Check J. H., 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: 73-6.
72. Tasdemir M., Tasdemir I., Kodama H., *et al.* **Is long-protocol gonadotropin releasing hormone agonist administration superior to the short protocol in ovarian stimulation for in vitro fertilization?** Int J Fertil Menopausal Stud 1995; 40: 25-8.
73. Templeton A., Morris J. K. and Parslow W. **Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment.** Lancet 1996; 348: 1402-6.
74. Terriou P., Giorgetti C., Auquier P., *et al.* **[Value of an embryo score to predict implantation].** Contracept Fertil Sex 1996; 24: 657-60.
75. Terriou P., Sapin C., Giorgetti C., *et al.* **Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age.** Fertil Steril 2001; 75: 525-31.
76. Tesarik J. and Greco E. **The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology.** Hum Reprod 1999; 14: 1318-23.

77. Thonneau P., Marchand S., Tallec A., *et al.* **Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989).** Hum Reprod 1991; 6: 811-6.
78. Thonneau P., Quesnot S., Ducot B., *et al.* **Risk factors for female and male infertility: results of a case-control study.** Hum Reprod 1992; 7: 55-8.
79. Thurin A., Hausken J., Hillensjo T., *et al.* **Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization.** N Engl J Med 2004; 351: 2392-402.
80. Thurin A., Hardarson T., Hausken J., *et al.* **Predictors of ongoing implantation in IVF in a good prognosis group of patients.** Hum Reprod 2005; 20: 1876-80.
81. Tiitinen A., Unkila-Kallio L., Halttunen M., *et al.* **Impact of elective single embryo transfer on the twin pregnancy rate.** Hum Reprod 2003; 18: 1449-53.
82. Van Montfoort A. P., Dumoulin J. C., Kester A. D., *et al.* **Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers.** Hum Reprod 2004; 19: 2103-8.
83. Van Os H. C., Alberda A. T., Janssen-Caspers H. A., *et al.* **The influence of the interval between in vitro fertilization and embryo transfer and some other variables on treatment outcome.** Fertil Steril 1989; 51: 360-2.
84. Van Royen E., Mangelschots K., De Neubourg D., *et al.* **Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer.** Hum Reprod 1999; 14: 2345-9.
85. Van Royen E., Mangelschots K., De Neubourg D., *et al.* **Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model.** Hum Reprod 2001; 16: 326-32.
86. Van Royen E., Mangelschots K., Vercruyssen M., *et al.* **Multinucleation in cleavage stage embryos.** Hum Reprod 2003; 18: 1062-9.
87. Van Steirteghem A. C., Nagy Z., Joris H., *et al.* **High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection.** Hum Reprod 1993; 8: 1061-6.

88. Vilska S., Tiitinen A., Hyden-Granskog C., *et al.* **Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth.** Hum Reprod 1999; 14: 2392-5.
89. Wilding M., Di Matteo L., D'Andretti S., *et al.* **An oocyte score for use in assisted reproduction.** J Assist Reprod Genet 2007; 24: 350-8.
90. Ziebe S., Petersen K., Lindenberg S., *et al.* **Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization.** Hum Reprod 1997; 12: 1545-9.
91. Zollner U., Zollner K. P., Hartl G., *et al.* **The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience.** Hum Reprod 2002; 17: 1327-33.



## **SITES INTERNET**

- Agence de Biomédecine

<http://www.agence-biomedecine.fr/>

- Le guide de l'assistance médicale à la procréation de l'Agence de Biomédecine

<http://www.procreationmedicale.fr/>

- Le rapport annuel 2006 de l'Agence de Biomédecine

<http://www.agence-biomedecine.fr/article/111>

- Association FIVNAT

<http://pagesperso-orange.fr/FIVNAT.fr/>

- Centre d'étude et de la conservation des œufs et du sperme (CECOS)

<http://amp-chu-besancon.univ-fcomte.fr/cecos/>

- Fédération de biologistes des laboratoires d'étude de la fécondation et de la conservation des œufs (BLEFCO)

<http://www.procreanet.com/pub/brochures/fiv/>

- Laboratoire Genèvevriier Biotechnologies

Brochure d'information et site Internet

<http://www.laboratoires-genevrier.com/fr/laboratoire/votre-sante/>


- Laboratoire Merck Serono

<http://www.lescheminsdelavie.com/>

<http://www.fertility.com/francais/index.jsp>

# ANNEXES

## ANNEXES 1. Feuilles de travail au laboratoire (FIV classique)

	<b>Formulaire enregistrement</b>		Centre d'Assistance Médicale à la Procréation																																		
	ENR XX	Fécondation in vitro FIV	Version A																																		
Mme	Mr	FIV N° N° ponction 2009-F																																			
<b>INDICATION</b> Dr																																					
Staff :	Cs Bio <input type="checkbox"/>	Demande AMP <input type="checkbox"/>	PI <input type="checkbox"/>	Certif. Vie Commune <input type="checkbox"/>																																	
<b>Bilan infectieux</b>	FEMME le TMS : le	HOMME le ml M/ml, Mob / / /		% FT																																	
<b>Protocole :</b>	dose FSHr OD :	ECHO le :	E2 : OG :	LII : E :																																	
<b>Ponction Le</b>	à	nb tubes :	OD : OG :	clair : SS : S : caillot : endomét :																																	
nb CCO :	OD :	OG :	vérification :	Lavage : ponctionneur anesthésiste transport OK																																	
<b>Sperme :</b>	conjoint donneur	Abst : Nb paillettes :	Frais : n° :	fractionné : CECOS :																																	
visco :	1 <sup>re</sup> fraction ml	M/ml, mob : / / /	FT : % ( T, PL, F)	autre : PI PC Passeport vérifié par																																	
	2 <sup>me</sup> fraction ml	M/ml, mob : / / /	C rondes : M/ml PN : %																																		
<b>TRT</b> sur gradient :	couches avec	ml de sperme	résultat :	M/ml mob : / / /																																	
<b>Insémination</b> à	h	avec	µl soit	spz par CCO vol puit :																																	
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th></th> <th>fait par</th> <th>milieux utilisés</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ponction ovo</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Examen &amp; traitement sperme</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Insémination</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Changement de bain</td> <td>Par : Heure:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>J1 H26</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>J2</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>J3</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>J5</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>J6</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Transfert</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>						fait par	milieux utilisés	ponction ovo			Examen & traitement sperme			Insémination			Changement de bain	Par : Heure:		J1 H26			J2			J3			J5			J6			Transfert		
	fait par	milieux utilisés																																			
ponction ovo																																					
Examen & traitement sperme																																					
Insémination																																					
Changement de bain	Par : Heure:																																				
J1 H26																																					
J2																																					
J3																																					
J5																																					
J6																																					
Transfert																																					
Congélation : <b>RESULTAT</b>	HCG:	Nombre embryons à transférer : sac :	AC :	Durée trajet : Acc :																																	
<b>Remarques :</b>																																					


**CULTURE ET DEVENIR FIV**

Mme  
Mr

	J1			H 26	J2	J3	J4	J5	J6	
	HP	PN	Z							
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										

Survie spz %      Fixation spz      SMC : B :  
 Nb ovo MII :      ( PF=      VG=      MI=      ) Dymorphie majeure :  
 Nb zygotes 2 PN :      3 PN :      1 PN :      arrêt division :  
 Nb embryons Nx j2 :      polyploïdes :  
 Sur      embryons en culture prolongée, blasto obtenus à j5 =      , à j6 =  
**TRANSFERT** :      embryons à J      avec KT :      par :      parfait/moyen/médiocre/échec/ reste ..... embryon  
**CONGELATION** à j3 :      j5 :      j6 :      **COTATION** :       B1600     B350    x1    x2     BIN

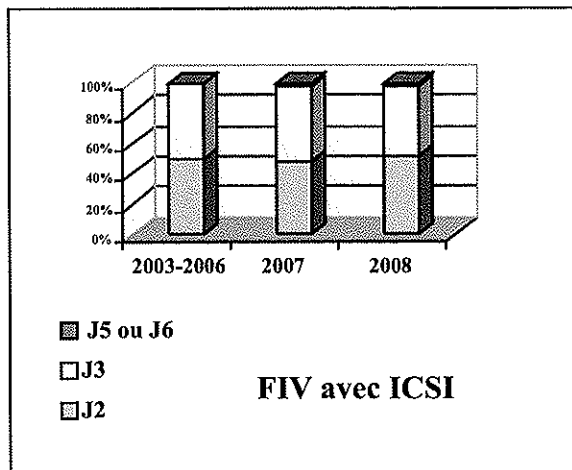
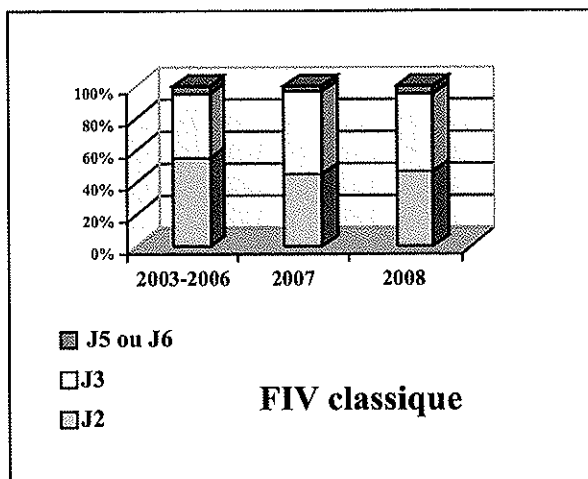
## ANNEXES 2. Feuilles de travail au laboratoire (FIV avec ICSI)

		<b>Formulaire enregistrement</b> Centre d'Assistance Médicale à la Procréation																										
		ENR XX	FIV avec ICSI	Version A																								
Mme	Mr	P n°	ICSI n°	N° ponction <b>2009 - I</b>																								
		<b>INDICATION</b>																										
FEMME : B infectieux le	HOMME : B infectieux le	TMS le	ml.	M/ml, Mob / / / FT : %																								
Staff : / / / Cs bio <input type="checkbox"/> Caryotype <input type="checkbox"/> FISH <input type="checkbox"/> Microdélétion du chr Y <input type="checkbox"/> Génétique <input type="checkbox"/> Demande AMP <input type="checkbox"/> PI <input type="checkbox"/> Certif vie commune <input type="checkbox"/> Consent ICSI <input type="checkbox"/> Consent décong. paillette																												
Protocole : dose FSHr		Echo le : / /	E2 :	LH : E :																								
OD :		OG :																										
PONCTION le : gynéco : anesthésiste : nb tubes : OD : OG : clair : SS : S : caillot : Endom :																												
nb CCO : OD : OG :		vérif : lavage : transport OK																										
SPERMIE : Ejaculé Frais Autoconservé Biopsie testiculaire P <sup>o</sup> épididymaire avant TRT sté avant PMA N° identification paillette : Nb utilisé : PI PC Passeport vérifié par :																												
Abstinence : j		Vol 1 : ml	Visé : Numéroté :	M/ml Mob : / / / FT : % ( T, Pl, F)																								
Fractionné ou 2 <sup>tes</sup> recueil		Vol 2 : ml	Visé : Numéroté :	M/ml Mob : / / / CRondes : M/ml PN : % SMC																								
Traitement :		Résultat TRT :																										
		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;"></th> <th style="width: 45%;">Opérateur</th> <th style="width: 30%;">Milieux utilisés :</th> <th style="width: 10%;">Jr</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ponction Ovocyte :</td> <td>Par : Tubes arrivés à :</td> <td></td> <td>J26 J2</td> </tr> <tr> <td>Sperme:Exam:TRT</td> <td>par</td> <td></td> <td>J3</td> </tr> <tr> <td>Décoronisation</td> <td>Par : Heure :</td> <td></td> <td>J5</td> </tr> <tr> <td>Préparation bte ICSI</td> <td>par</td> <td></td> <td>J6</td> </tr> <tr> <td>Micro injection</td> <td>Heure début Heure fin par</td> <td></td> <td>Transfert</td> </tr> </tbody> </table>				Opérateur	Milieux utilisés :	Jr	Ponction Ovocyte :	Par : Tubes arrivés à :		J26 J2	Sperme:Exam:TRT	par		J3	Décoronisation	Par : Heure :		J5	Préparation bte ICSI	par		J6	Micro injection	Heure début Heure fin par		Transfert
	Opérateur	Milieux utilisés :	Jr																									
Ponction Ovocyte :	Par : Tubes arrivés à :		J26 J2																									
Sperme:Exam:TRT	par		J3																									
Décoronisation	Par : Heure :		J5																									
Préparation bte ICSI	par		J6																									
Micro injection	Heure début Heure fin par		Transfert																									
Congélation embryon :		Nombre embryons à transférer :		Durée trajet : Tel :																								

	SPZ			OVOCYTE		ICSI				II						Remarque				
	immobilis	immobilis	aplique	dysmorphie	$\omega$	Position ep	Qual. inj. MP	Spz. micropour	différents	Effic. colle	gp	PN	Z	H 26	J2		J3	J4	J5	J6
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				

Nb CCO =      Nb ovo MII =      (PF=      VG=      MI=      Deg=      )      Nb ovo micro injectés :      Dysmorphie :  
 Nb zygotés 2 PN :      3 PN :      1 PN :      arrêt division :      Deg :      Nb embryons Nx j2 :      Emb polyfoïdes :      fragment\* totale :  
 Sur      embryons en culture prolongée, blasto obtenus à j5 =      , à j6 =  
**TRANSFERT** :      embryons à J      avec KT :      par :      parfait / moyen / médiocre / échec / reste ..... emb  
**CONGELATION**      à j3.      à j5.      à j6  
**RÉSULTAT** :      HCG :      SAC :      AC :      accouché :  
**Remarque** :      **CODAGE** :  B2800     B350    x1    x2     B11N

### ANNEXES 3. Evolution des jours de transferts de 2003 à 2008



Années	Jour de	FIV classique	FIV avec ICSI
2003-2006	J1	-	1 (0,2%)
	J2	335 (54,8%)	198 (49,9%)
	J3	253 (41,4%)	197 (49,7%)
	J5-J6	23 (3,8%)	1 (0,2%)
2007	J2	88 (44,7%)	67 (48,6%)
	J3	102 (51,8%)	68 (49,3%)
	J5-J6	7 (3,5%)	3 (2,1%)
2008	J2	90 (47,4%)	111 (51,6%)
	J3	90 (47,4%)	98 (45,6%)
	J5-J6	10 (5,2%)	6 (2,8%)

# TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE.....	7
LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
LEXIQUE STATISTIQUE.....	11
INTRODUCTION.....	13
<b>PARTIE 1 : RAPPELS BIOLOGIQUES ET CLINIQUES.....</b>	<b>15</b>
<b>CHAPITRE 1. LA FECONDATION NATURELLE.....</b>	<b>16</b>
1. LA GAMETOGENESE.....	16
1-1. <i>La spermatogenèse</i> .....	17
1-1-A. Les différents stades de la spermatogenèse.....	17
1-1-B. Le spermatozoïde.....	20
1-1-C. L'éjaculation.....	21
1-1-D. Migration des spermatozoïdes dans l'appareil génital de la femme.....	21
1-2. <i>L'ovogenèse</i> .....	22
1-2-A. Les différents stades de l'ovogenèse.....	22
1-2-B. La folliculogenèse.....	22
1-2-C. Cycle ovarien et ovulation.....	23
2. LA FECONDATION.....	26
3. LE DEVELOPPEMENT PREIMPLANTATOIRE.....	29
3-1. <i>La segmentation</i> .....	29
3-2. <i>La compaction</i> .....	29
4. L'IMPLANTATION.....	32
<b>CHAPITRE 2. L'INFERTILITE DU COUPLE.....</b>	<b>34</b>
1. QUELQUES DEFINITIONS.....	34
1-1. <i>Fertilité et infertilité</i> .....	34
1-2. <i>Fécondité et infécondité</i> .....	34
1-3. <i>Fécondabilité</i> .....	34
1-4. <i>Le délai nécessaire à concevoir</i> .....	35
2. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES.....	36
2-1. <i>L'importance de l'infertilité</i> .....	36
2-2. <i>Les causes d'infertilité</i> .....	36
2-2-A. Généralités.....	36
2-2-B. Causes d'infertilité chez la femme.....	37
2-2-C. Causes d'infertilité chez l'homme.....	38
<b>CHAPITRE 3. L'EXAMEN DU COUPLE INFERTILE.....</b>	<b>41</b>
1. LE BILAN FEMININ D'INFERTILITE.....	41
1-1. <i>Interrogatoire</i> .....	41
1-2. <i>Examen clinique</i> .....	42
1-3. <i>Examens complémentaires</i> .....	42

1-3-A.	La courbe de température ou courbe ménothermique .....	42
1-3-B.	Test post-coïtal ou test de Hühner.....	43
1-3-C.	Étude de la morphologie et de la perméabilité tubaire.....	43
1-3-D.	Les examens sanguins.....	45
1-3-D-a.	Le bilan hormonal féminin .....	45
1-3-D-b.	Le caryotype.....	45
1-3-D-c.	Dosages immunologiques.....	45
2.	LE BILAN MASCULIN D'INFERTILITE.....	46
2-1.	<i>Interrogatoire</i> .....	46
2-2.	<i>Examen clinique</i> .....	47
2-3.	<i>Examens complémentaires</i> .....	48
2-3-A.	Le spermogramme.....	48
2-3-B.	Autres examens du sperme.....	50
2-3-B-a.	Le test de migration survie (TMS) ou test de capacitation des spermatozoïdes.....	50
2-3-B-b.	La recherche d'anticorps anti-spermatozoïdes (ACAS).....	50
2-3-B-c.	La biochimie du sperme.....	50
2-3-B-d.	La spermoculture.....	50
2-3-C.	Les dosages hormonaux.....	51
2-3-D.	Les examens échographiques.....	51
2-3-E.	Les examens génétiques.....	51
2-3-F.	La biopsie testiculaire.....	52
2-3-G.	Autres examens.....	52

## **PARTIE 2 : L'ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION..... 54**

### **CHAPITRE 4. LA PRATIQUE DE L'AMP..... 55**

1.	LES TECHNIQUES DE PROCREATION MEDICALEMENT ASSISTEE : INDICATIONS ET DEROULEMENT.....	55
1-1.	<i>L'induction de l'ovulation</i> .....	55
1-2.	<i>L'insémination artificielle</i> .....	55
1-2-A.	Principes.....	55
1-2-B.	Indications.....	55
1-3.	<i>La fécondation in vitro (FIV) dite « classique »</i> .....	56
1-3-A.	Principes.....	56
1-3-B.	Indications.....	57
1-4.	<i>La fécondation in vitro avec micro-injection ou ICSI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection)</i> .....	58
1-4-A.	Principes.....	58
1-4-B.	Indications.....	59
1-5.	<i>L'AMP avec tiers donneur</i> .....	60
1-5-A.	Le don d'ovocytes.....	60
1-5-B.	Le don de sperme.....	60
1-5-C.	Le don d'embryon.....	60
2.	L'ORGANISATION DE L'AMP EN FRANCE.....	61
2-1.	<i>Le CECOS (Centre d'étude de la conservation des œufs et du sperme)</i> .....	61
2-2.	<i>Le GEFF, le BLEFCO puis le registre FIV-NAT</i> .....	61
2-3.	<i>La loi de bioéthique du 29 juillet 1994 modifiée le 6 Août 2004</i> .....	61
2-4.	<i>L'Agence de Biomédecine</i> .....	62



3.	ÉPIDEMIOLOGIE : BILAN DE L'AGENCE DE BIOMÉDECINE EN 2006.....	63
3-1.	<i>Bilan général 2006</i> .....	63
3-2.	<i>Bilan 2006: FIV classique et ICSI</i> .....	65
3-2-A.	Fécondation in vitro classique.....	65
3-2-B.	FIV avec ICSI.....	66
<b>CHAPITRE 5. ASPECTS CLINIQUES ET TECHNIQUES DE L'AMP .....</b>		<b>67</b>
1.	LA PRISE EN CHARGE DES COUPLES ET LE DÉROULEMENT D'UNE TENTATIVE.....	67
1-1.	<i>Le bilan d'infertilité</i> .....	67
1-2.	<i>Les formalités administratives</i> .....	67
1-3.	<i>Choix de la technique</i> .....	67
1-4.	<i>La consultation de biologie</i> .....	68
1-5.	<i>Le déroulement d'une tentative</i> .....	68
2.	LA STIMULATION OVARIENNE ET LE DÉCLENCHEMENT DE L'OVULATION.....	69
2-1.	<i>Les protocoles de stimulation ovarienne</i> .....	69
2-1-A.	Généralités.....	69
2-1-B.	Utilisation des agonistes du GnRH .....	70
2-1-C.	Utilisation des antagonistes du GnRH.....	71
2-1-D.	Le choix du protocole de stimulation .....	73
2-2.	<i>La surveillance de la croissance folliculaire</i> .....	73
2-2-A.	Surveillance échographique des ovaires.....	73
2-2-B.	Surveillance hormonale .....	74
2-3.	<i>Le déclenchement de l'ovulation</i> .....	74
3.	LA PONCTION FOLLICULAIRE ET LE RECUEIL DES OVOCYTES.....	75
4.	LE RECUEIL ET LE TRAITEMENT DES SPERMATOZOÏDES .....	76
5.	LA MISE EN FÉCONDATION EN FIV CLASSIQUE ET EN ICSI.....	77
5-2.	<i>La fécondation in vitro conventionnelle ou classique</i> .....	77
5-3.	<i>La fécondation in vitro avec micro-injection (ICSI)</i> .....	78
6.	LA CULTURE <i>IN VITRO</i> DES EMBRYONS ET L'OBSERVATION DES EMBRYONS .....	80
7.	LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE .....	86
7-1.	<i>Le geste médical</i> .....	86
7-2.	<i>Le nombre d'embryons à transférer</i> .....	87
7-2-A.	Le choix du nombre d'embryons à transférer .....	87
7-2-B.	Vers le transfert d'embryon unique.....	87
8.	LA CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS SURNUMÉRAIRES .....	88
<b>PARTIE 3 : ETUDE STATISTIQUE.....</b>		<b>89</b>
<b>CHAPITRE 6. L'ANALYSE DESCRIPTIVE.....</b>		<b>90</b>
1.	INTRODUCTION.....	90
2.	MATÉRIELS ET MÉTHODE.....	90
2-1.	<i>Schéma d'étude</i> .....	90
2-2.	<i>Population étudiée</i> .....	91
2-3.	<i>Le déroulement d'une tentative</i> .....	93
2-3-A.	La stimulation ovarienne .....	93

2-3-B.	Le déclenchement de l'ovulation .....	93
2-3-C.	La FIV classique et la FIV avec ICSI .....	94
2-3-D.	Le transfert embryonnaire .....	95
2-3-E.	L'issue de la tentative.....	95
2-4.	<i>La base de donnée</i> .....	95
2-5.	<i>Analyses statistiques</i> .....	97
2-5-A.	Les variables dépendantes .....	98
2-5-B.	Les variables indépendantes .....	98
2-5-B-a.	En FIV classique.....	98
2-5-B-b.	En FIV avec ICSI.....	99
3.	RÉSULTATS.....	100
3-1.	<i>Analyse descriptive</i> .....	100
3-1-A.	Le couple .....	100
3-1-B.	Les données au laboratoire .....	101
3-1-C.	Le transfert.....	101
3-1-D.	L'issue de la tentative et des grossesses .....	102
3-2.	<i>Recherche de facteurs prédictifs en FIV classique</i> .....	103
3-2-A.	1. Le taux de fécondation en FIV classique .....	103
3-2-A-a.	Analyse univariée.....	103
3-2-A-b.	Analyse multivariée .....	103
3-2-B.	2. La grossesse biochimique en FIV classique .....	104
3-2-B-a.	Analyse univariée.....	104
3-2-B-b.	Analyse multivariée .....	105
3-2-C.	L'accouchement en FIV classique .....	106
3-2-C-a.	Analyse univariée .....	106
3-2-C-b.	Analyse multivariée .....	106
3-2-D.	L'accouchement de jumeaux en FIV classique.....	107
3-2-D-a.	Analyse univariée.....	107
3-2-D-b.	Analyse multivariée .....	107
3-3.	<i>Recherche de facteurs prédictifs en FIV avec ICSI</i> .....	107
3-3-A.	1. Le taux de fécondation en FIV avec ICSI.....	107
3-3-A-a.	Analyse univariée.....	107
3-3-A-b.	Analyse multivariée .....	108
3-3-B.	2. La grossesse biochimique en FIV avec ICSI.....	108
3-3-B-a.	Analyse univariée.....	108
3-3-B-b.	Analyse multivariée .....	108
3-3-C.	L'accouchement en FIV avec ICSI.....	109
3-3-C-a.	Analyse univariée .....	109
3-3-C-b.	Analyse multivariée .....	110
3-3-D.	L'accouchement de jumeaux en FIV avec ICSI .....	110
3-3-D-a.	Analyse univariée.....	110
3-3-D-b.	Analyse multivariée .....	110
3-4.	<i>Récapitulatif des facteurs prédictifs</i> .....	111
4.	DISCUSSION .....	111
	<i>Analyse descriptive</i> .....	111
	<i>Les facteurs prédictifs</i> .....	118
<b>CHAPITRE 7. RECHERCHE DE CRITERES POUR LE SCORE EMBRYONNAIRE .....</b>		<b>130</b>

1. INTRODUCTION-BIBLIOGRAPHIE.....	130
1-1-A. Intérêts d'établir un score embryonnaire.....	130
1-1-B. Établir un score embryonnaire.....	131
2. MATÉRIELS ET METHODE.....	135
2-1. <i>Schéma d'étude</i> .....	135
2-2. <i>Population étudiée</i> .....	135
2-3. <i>Le déroulement d'une tentative</i> .....	136
2-4. <i>La base de donnée</i> .....	136
2-5. <i>Analyses statistiques</i> .....	137
3. RÉSULTATS.....	138
4. DISCUSSION.....	139
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>142</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>143</b>
<b>SITES INTERNET.....</b>	<b>153</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>154</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>159</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° 368

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER  
LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

**RESUME :**

Deux études de cohortes rétrospectives ont permis l'analyse statistique de la pratique de l'AMP en FIV classique et avec micro-injection au centre d'AMP de Limoges de 2003 à 2006. La première a étudié l'ensemble des tentatives réalisées en FIV classique (n=785) et en FIV avec ICSI (n=475) durant cette période. Des facteurs prédictifs de réussite ou d'échec de la tentative ont été mis en évidence après analyses multivariées : le taux de fécondation est plus bas lorsque l'on utilise un protocole court. Ce taux semble augmenter avec un temps de co-incubation raccourci, avec le pourcentage de térazoospermie et de survie à 17 heures, et en fonction du nombre d'ovocytes injectés en FIV avec ICSI. Les taux de grossesses peuvent aussi varier en fonction du score du zygote, de la division précoce de l'embryon à la 26<sup>e</sup> heure et de la morphologie au deuxième jour. De plus, l'âge de la patiente diminue les chances de grossesses et d'accouchements. La deuxième étude de cohorte a étudié 1444 embryons et leurs critères en vue de créer un score embryonnaire et d'améliorer le taux d'implantation. Les résultats ont montré que l'âge diminue les chances d'accouchements, et que les embryons transférés au troisième jour et ceux ayant une bonne morphologie ont un meilleur taux d'accouchements. Malheureusement, l'ensemble de ces critères n'ont pas été suffisants d'un point de vue statistique pour construire un score embryonnaire.

---

**TITLE : DESCRIPTIVE RESULT ANALYSIS OF IN VITRO FERTILIZATION WITH AND WITHOUT MICRO-INJECTION IN LIMOGES HOSPITAL'S ART LABORATORY FROM 2003 TO 2006**

**Attempt at embryo score determination**

---

**SUMMARY :** Two retrospective cohort studies allowed the statistical analysis of Assisted Reproductive Treatment practice in conventional in vitro fertilization and with intracytoplasmic sperm injection at the Limoges center from 2003 to 2006. The first studied whole cycle in conventional IVF(n=785) and IVF with ICSI(n=475). Predictive factors of success or failure were brought out in a multivariate analysis : fertilization rates were lower with short protocol. This rate increase with a short incubation of sperm and oocyte, with percentage of teratozoospermia and with the survival rate after 17 hours, and with the number of ICSI-injected oocytes. Pronuclear scoring, early embryo cleavage (within 26 h post-insemination) and the 4-cell stage embryo morphology had a predictive value in the pregnancy rate. Furthermore pregnancy and delivery rates decreased with patient age. The second cohort studied 1,444 embryos, to determine an evidence-based integrated score and to improve implantation. Results showed statistically lower delivery rates in older patients and higher delivery rates with good embryo morphology and embryos transfers on day three. Unfortunately, variables as a whole did not enable to build a embryo score.

---

**DISCIPLINE : BIOLOGIE MEDICALE spécialité BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION**

---

**MOTS-CLES :** facteurs prédictifs/ FIV/ ICSI /score embryonnaire /taux d'accouchements /taux de fécondation /taux de grossesses

**KEY WORDS :** embryo score / factors of prediction /fertilization rates /ICSI /IVF / delivery rate /pregnancy rate

---

**LABORATOIRE D'ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION**

**HOPITAL DE LA MERE, ET DE L'ENFANT**

**8, avenue Dominique Larrey 87042 Limoges cedex**

**Directeur de thèse : Dr Sophie DELCLEVE-PAULHAC**