



HAL
open science

Absence d'embryons ou embryons non transférables en ICSI: que dire aux patients?: Une étude nancéenne et revue de la littérature

Cécile Tomaszewski

► To cite this version:

Cécile Tomaszewski. Absence d'embryons ou embryons non transférables en ICSI: que dire aux patients?: Une étude nancéenne et revue de la littérature. Sciences du Vivant [q-bio]. 2009. hal-01733002

HAL Id: hal-01733002

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733002v1>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement

dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

Cécile TOMASZEWSKI

Le 19 octobre 2009

ABSENCE D'EMBRYONS OU EMBRYONS

NON TRANSFERABLES EN ICSI :

QUE DIRE AUX PATIENTS ?

UNE ETUDE NANCEENNE ET REVUE DE LA LITTÉRATURE

Examineurs de la thèse :

Monsieur B. FOLIGUET	Professeur	Président
Monsieur P. JUDLIN	Professeur	Juge
Monsieur G. WERYHA	Professeur	Juge
Madame A. ZACCABRI	Docteur en médecine	Juge
Monsieur T. FORGES	Docteur en médecine	Juge

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement

dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

Cécile TOMASZEWSKI

Le 19 octobre 2009

ABSENCE D'EMBRYONS OU EMBRYONS

NON TRANSFERABLES EN ICSI :

QUE DIRE AUX PATIENTS ?

UNE ETUDE NANCEENNE ET REVUE DE LA LITTÉRATURE

Examineurs de la thèse :

Monsieur B. FOLIGUET	Professeur	Président
Monsieur P. JUDLIN	Professeur	Juge
Monsieur G. WERYHA	Professeur	Juge
Madame A. ZACCABRI	Docteur en médecine	Juge
Monsieur T. FORGES	Docteur en médecine	Juge

Président de l'Université : Professeur Jean-Pierre FINANCE

Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE

Vice Doyen Recherche : Professeur Jean-Louis GUEANT

Vice Doyen Pédagogie : Professeur Annick BARBAUD

Vice Doyen Campus : Professeur Marie-Christine BÉNÉ

Asseseurs :

du 1^{er} Cycle :

du 2^{ème} Cycle :

du 3^{ème} Cycle :

Filières professionnalisées :

Prospective :

FMC/EPP :

M. Christophe NEMOS

M. le Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI

M. le Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT

M. le Professeur Christophe CHOSEROT

M. le Professeur Laurent BRESLER

M. le Professeur Jean-Dominique DE KORWIN

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX

Professeur Jacques ROLAND – Professeur Patrick NETTER

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre ALEXANDRE – Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain BERTRAND - Pierre BEY - Jean BEUREY
Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL - Claude CHARDOT
Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE - Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS
Michel DUC - Jean DUHEILLE - Adrien DUPREZ - Jean-Bernard DUREUX - Gabriel FAIVRE – Gérard FIEVE - Jean FLOQUET
Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Hubert GERARD - Jean-Marie GILGENKRANTZ
Simone GILGENKRANTZ - Oliéro GUERCI - Pierre HARTEMANN - Claude HURIET - Christian JANOT - Jacques LACOSTE
Henri LAMBERT - Pierre LANDES - Alain LARCAN - Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE
Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS - Michel MANCIAUX - Jean-Pierre MALLIÉ - Pierre MATHIEU
Denise MONERET-VAUTRIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN - Gilbert PERCEBOIS
Claude PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON - Jean-Marie POLU – Jacques POUREL - Jean PREVOT
Antoine RASPILLER - Michel RENARD - Jacques ROLAND - René-Jean ROYER - Paul SADOUL - Daniel SCHMITT
Jean SOMMELET - Danièle SOMMELET - Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT - Augusta TREHEUX - Hubert UFFHOLTZ
Gérard VAILLANT – Paul VERT - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET - Michel WAYOFF - Michel WEBER

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Pierre LASCOMBES – Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Professeur Bernard FOLIGUET

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)

Professeur Denis REGENT – Professeur Michel CLAUDON

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER

Professeur René ANXIONNAT

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Professeur Ali DALLOUL

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)

Professeur Alain LE FAOU – Professeur Alain LOZNIEWSKI

3^{ème} sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON

Professeur Francis GUILLEMIN – Professeur Denis ZMIROU-NAVIER

2^{ème} sous-section : (Médecine et santé au travail)

Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Professeur François KOHLER – Professeur Éliane ALBUSSON

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Professeur Thomas LECOMPTE – Professeur Pierre BORDIGONI

Professeur Jean-François STOLTZ – Professeur Pierre FEUGIER

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY

Professeur Didier PEIFFERT – Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie et réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ

Professeur Paul-Michel MERTES – Professeur Gérard AUDIBERT

2^{ème} sous-section : (Réanimation médicale ; médecine d'urgence)

Professeur Alain GERARD – Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT

Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Professeur François PAILLE – Professeur Gérard GAY – Professeur Faiez ZANNAD

**49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE,
HANDICAP et RÉÉDUCATION**

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Hervé VESPIGNANI
Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE

2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE
Professeur Thierry CIVIT

3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC – Professeur Bernard KABUTH

5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean PAYSANT

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeur Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD

Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénérologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Professeur François DAP – Professeur Gilles DAUTEL

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIORESPIRATOIRE et VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie ; addictologie)

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

2^{ème} sous-section : (Cardiologie)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE – Professeur Nicolas SADOUL

Professeur Christian de CHILLOU

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT - Professeur Jean-Pierre CARTEAUX – Professeur Loïc MACÉ

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)

Professeur Marc-André BIGARD - Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

2^{ème} sous-section : (Chirurgie digestive)

3^{ème} sous-section : (Néphrologie)

Professeur Michèle KESSLER – Professeur Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT

4^{ème} sous-section : (Urologie)

Professeur Philippe MANGIN – Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY

Professeur Athanase BENETOS - Professeur Gisèle KANNY

2^{ème} sous-section : (Chirurgie générale)

Professeur Patrick BOISSEL – Professeur Laurent BRESLER

Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

**54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE,
ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

1^{ère} sous-section : (Pédiatrie)

Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER
Professeur François FEILLET - Professeur Cyril SCHWEITZER

2^{ème} sous-section : (Chirurgie infantile)

Professeur Michel SCHMITT – Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE

3^{ème} sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)

Professeur Michel SCHWEITZER – Professeur Jean-Louis BOUTROY
Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Patricia BARBARINO

4^{ème} sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)

Professeur Claude SIMON – Professeur Roger JANKOWSKI

2^{ème} sous-section : (Ophtalmologie)

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeur Karine ANGIOI-DUPREZ

3^{ème} sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)

Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeur Etienne SIMON

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeur Sandrine BOSCHI-MULLER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Thierry HAUMONT

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Docteur Edouard BARRAT - Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Docteur Béatrice MARIE

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Docteur Marie-Hélène LAURENS – Docteur Jean-Claude MAYER

Docteur Pierre THOUVENOT – Docteur Jean-Marie ESCANYE – Docteur Amar NAOUN

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)

Docteur Damien MANDRY

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Docteur Jean STRACZEK – Docteur Sophie FREMONT

Docteur Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN – Docteur Catherine MALAPLATE-ARMAND

Docteur Shyue-Fang BATTAGLIA

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Docteur Nicole LEMAU de TALANCE

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Docteur Véronique DECOT-MAILLERET

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Docteur Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)

Docteur Francine MORY – Docteur Véronique VENARD

2^{ème} sous-section : (Parasitologie et mycologie)

Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU – Madame Marie MACHOUART

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Epidémiologie, économie de la santé et prévention)

Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE – Docteur Frédérique CLAUDOT

3^{ème} sous-section (Médecine légale et droit de la santé)

Docteur Laurent MARTRILLE

4^{ère} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Docteur Pierre GILLOIS – Docteur Nicolas JAY

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Docteur François SCHOONEMAN

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie : cancérologie (type mixte : biologique))

Docteur Lina BOLOTINE

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Docteur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT

4^{ème} sous-section : (Génétiologie)

Docteur Christophe PHILIPPE – Docteur Céline BONNET

**48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT – Docteur Nicolas GAMBIER

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Docteur Patrick ROSSIGNOL

50^{ème} Section : RHUMATOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Docteur Anne-Christine RAT

**54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE,
ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

5^{ème} sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale)

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} section : SCIENCE ÉCONOMIE GÉNÉRALE

Monsieur Vincent LHUILLIER

40^{ème} section : SCIENCES DU MÉDICAMENT

Monsieur Jean-François COLLIN

60^{ème} section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE

Monsieur Alain DURAND

61^{ème} section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Monsieur Jean REBSTOCK – Monsieur Walter BLONDEL

64^{ème} section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
Mademoiselle Marie-Claire LANHERS

65^{ème} section : BIOLOGIE CELLULAIRE
Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY
Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE – Monsieur Christophe NEMOS
Madame Natalia DE ISLA – Monsieur Pierre TANKOSIC

66^{ème} section : PHYSIOLOGIE
Monsieur Nguyen TRAN

67^{ème} section : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ÉCOLOGIE
Madame Nadine MUSSE

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Professeur associé Alain AUBREGE
Docteur Francis RAPHAEL
Docteur Jean-Marc BOIVIN
Docteur Jean-Louis ADAM
Docteur Elisabeth STEYER

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Pierre BEY - Professeur Michel BOULANGE
Professeur Jean-Pierre CRANCE - Professeur Jean FLOQUET - Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ
Professeur Simone GILGENKRANTZ – Professeur Henri LAMBERT - Professeur Alain LARCAN
Professeur Denise MONERET-VAUTRIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS – - Professeur Guy PETIET
Professeur Luc PICARD - Professeur Michel PIERSON - Professeur Jacques POUREL
Professeur Jacques ROLAND - - Professeur Michel STRICKER - Professeur Gilbert THIBAUT
Professeur Paul VERT - Professeur Michel VIDAILHET

=====

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Norman SHUMWAY (1972)
Université de Stanford, Californie (U.S.A)
Professeur Paul MICHIELSEN (1979)
Université Catholique, Louvain (Belgique)
Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)
Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)
Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)
Wanderbilt University, Nashville (U.S.A)
Harry J. BUNCKE (1989)
Université de Californie, San Francisco (U.S.A)
Professeur Daniel G. BICHET (2001)
Université de Montréal (Canada)
Professeur Brian BURCHELL (2007)
Université de Dundee (Royaume Uni)

Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)
Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)
Professeur James STEICHEN (1997)
Université d'Indianapolis (U.S.A)
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
*Centre Universitaire de Formation et de Perfectionnement des
Professionnels de Santé d'Hô Chi Minh-Ville (VIËTNAM)*

Professeur Marc LEVENSTON (2005)
Institute of Technology, Atlanta (USA)

A notre Maître et Président du jury de thèse,

M le Professeur Bernard FOLIGUET

Professeur d'Histologie-Embryologie, Cytogénétique

Officier dans l'Ordre des Palmes Académiques

Vous nous faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse et de juger notre travail. Nous vous sommes très reconnaissants de nous avoir accordé votre confiance pour la réalisation de ce travail. Nous avons apprécié vos qualités scientifiques, pédagogiques et votre humanité. Veuillez trouver dans ce travail, l'expression de notre plus profond respect.

A nos Maîtres et Juges,

Monsieur le Professeur Philippe JUDLIN

Professeur de Gynécologie Obstétrique

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Nous avons le plaisir au cours de l'internat de travailler avec vous. Votre rigueur dans le travail et votre gentillesse ont suscité notre admiration. Nous vous remercions pour votre écoute attentive et bienveillante pendant ces années. Veuillez trouver dans ce travail, le témoignage de notre considération et de notre plus profond respect.

Monsieur le Professeur Georges WERYHA

Professeur en Endocrinologie

Nous vous remercions d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Votre présence dans ce jury est enrichissante et reflète la multidisciplinarité de la Médecine de la Reproduction et de la Gynécologie Médicale. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de notre gratitude et de notre plus profond respect

Madame le Docteur Annie ZACCABRI

Docteur en Médecine

Responsable du service d'Aide Médicale à la
Procréation,

Nous vous remercions d'avoir dirigé ce travail.

Votre énergie, votre rigueur dans le travail et votre gentillesse ont suscité notre admiration. Nous vous remercions pour vos conseils éclairés et vos réponses rapides.

Pour la compétence que nous vous connaissons, nous vous exprimons notre reconnaissance et notre respect.

Monsieur le Docteur Thierry FORGES

Docteur en Médecine

Biologiste au Laboratoire de Biologie de la Reproduction

Nous vous remercions d'avoir accepté de participer à ce jury. Votre disponibilité et votre attention ont favorisé ce travail de thèse. Nous avons apprécié travailler avec vous au cours de notre internat. A cette occasion nous avons pu apprécier vos compétences, la limpidité de vos explications et votre sympathie. Veuillez trouver dans ce travail, le témoignage de notre grande considération et de notre profond respect

A mes Maîtres d'internat,

Madame le Docteur DELAPORTE

Madame le Docteur DIETSCH

Madame le Docteur GUILLET – MAY

Monsieur le Docteur GUNTHER

Monsieur le Docteur MITTON

Madame le Docteur PERRIN

Monsieur le Docteur RAGAGE

Monsieur le Docteur THIEBAUGEORGES

Monsieur le Docteur WELTER

A nos aînés qui ont su nous transmettre leur savoir

Monsieur le Docteur AMROUSSI

Madame le Docteur BARBIER-LEREBOURS

Monsieur le Docteur COLLIN

Madame le Docteur DAHLHOFF

Madame le Docteur DANDACHI

Madame le Docteur DILIGENT

Monsieur le Docteur FERDILUS

Madame le Docteur LESTRADE

Madame le Docteur MASIAS

Madame MERCY

Madame le Docteur MUNOZ

Madame le Docteur POULIZAC

Madame le Docteur SHWEITZER

Monsieur le Docteur VILLEROY DE GALHAU

A ma mère, mon frère, ma famille qui m'ont toujours soutenue dans mes choix, les meilleurs comme les pires

A Jean-Michel, pour sa compréhension, son soutien et sa patience de tous les instants.

A mes amis,

A Carine, Julie et Nicolas, Elodie, Nathalie, Aurélie, Oriane pour notre amitié solide et sans frontière

A Aline, pour notre amitié qui, bien sûr, dépassera les frontières de la Lorraine

A Emilie et sa jolie famille pour ses précieux conseils et les formidables moments passés ensemble

A Esther, pour notre amitié née au laboratoire, IIU, FIV ou spontanée ? Qu'elle poursuive son chemin

A Marie B, une super sage-femme et amie

A Nadia pour ce qu'elle m'a appris, ses conseils avisés et surtout sa théorie de la petite étoile

A Maud, Marie-Caroline et Marie-Laure pour leur inoubliable réconfort des premiers jours

A mes collègues d'internat

A la sympathique équipe d'AMP, aux sages-femmes, aux techniciennes de FIV et techniciens de spermologie, aux secrétaires, avec qui j'ai adoré travailler

A l'équipe de Briey, chaleureuse et dynamique, un vrai bonheur

Aux sages-femmes et infirmières de Thionville qui me laissent un souvenir impérissable

Au personnel de la Maternité de Nancy

A tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce travail de thèse

SERMENT

"Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux,

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission.

Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ;

Que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque".

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION ET REVUE DE LA LITTERATURE	18
1. INTRODUCTION.....	19
2. REVUE DE LA LITTERATURE	21
2.1. La technique de l'ICSI.....	21
2.2. Reflet de l'épidémiologie de l'ICSI en France.....	24
2.3. Paramètres féminins influençant l'ICSI	26
2.4. Influence des paramètres de la tentative.....	48
2.5. Influence des paramètres de la stimulation.....	49
2.6. Paramètres masculins	55
2.7. Facteurs techniques influençant le succès en ICSI.....	77
2.8. Approche morphologique et cinétique du développement embryonnaire.....	81
2.9. L'avenir pour l'ICSI.....	90
DEUXIEME PARTIE : ETUDE PERSONNELLE NANCEENNE.....	97
1. Objectifs de l'étude :	98
2. Matériel et Méthode :	98
2.1. Description de l'étude.....	98
2.2. Inclusion des patients	98
2.3. La procédure de FIV- ICSI du laboratoire de FIV de la Maternité régionale de Nancy	99
2.4. Données recueillies pour l'étude	103
2.5. Les méthodes statistiques	104
3. Résultats	104
3.1. Analyse bivariée de la population étudiée.....	104
3.2. Analyse multivariée.....	124
3.3. Analyse des paramètres liés à la qualité ovocytaire ou embryonnaire	125
4. Discussion.....	135
5. Conclusion.....	142

6. Bibliographie	143
7. Annexes	155
7.1. Classification embryonnaire	155
7.2. Observation chronologique des embryons	155
7.3. Ovocytes dysmorphiques	155

Liste des abréviations et définitions

AMH : Hormone anti-Mullerienne

AMP : Aide Médicale à la Procréation

CCO : Complexes cumulo-ovocytaires

DAO : Dérivés actifs de l'oxygène

ESHRE : European Society of Human Reproduction and Embryology

GP : Globule polaire

HSO : Hyperstimulation ovarienne

ICSI : Intra-cytoplasmic Sperm Injection

IUI : Insémination Intra- Utérine

IMSI: Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection

PVP (PVP Clinical Grade) : Polyvinylpyrrolidone

SET : Single embryo transfert

SOPK : Syndrome des ovaires polykystiques

SPZ ou spz : Spermatozoïde

SUZI : Sub Zonal Sperm Injection

IVF ou Global : Milieu synthétique pour culture cellulaire in vitro

Flushing Medium : Milieu de lavage

Décoronisation : Isoler l'ovocyte des cellules folliculaires qui l'entourent.

Hyaluronidase : Enzyme qui permet la dissociation chimique des cellules folliculaires qui entourent l'ovocyte.

PolScope : microscope à lumière polarisée permettant l'étude non-invasive du fuseau méiotique

PVP (PVP Clinical Grade) : Polyvinylpyrrolidone. Substance visqueuse qui permet le ralentissement de la progression des spermatozoïdes.

Huile Minérale (Liquid Paraffin) : huile qui versée sur un milieu permet d'isoler celui-ci des contaminations extérieures tout en respectant les échanges thermiques et gazeux.

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION ET REVUE DE LA
LITTERATURE

1. INTRODUCTION

Depuis sa découverte, l'essor de la FIV avec micro-injection intra-cytoplasmique du spermatozoïde (FIV-ICSI) est incontestable. L'augmentation de la réalisation de l'ICSI ces dernières années semble résulter principalement de l'extension des indications de l'ICSI et du passage plus rapide à l'ICSI en cas de qualité spermatique modérément altérée.

La fécondation in vitro avec micromanipulation ou l'ICSI, en augmentant les taux de grossesse et de fécondation, a freiné les investigations et traitements des infertilités masculines sévères. Mais, en outrepassant les barrières physiologiques de la fécondation en FIV : la capacitation, la fixation à la zone pellucide, suivie de la réaction acrosomique permettant l'accolement du spermatozoïde à l'ovocyte avant l'incorporation de celui-ci, l'ICSI a permis de mieux comprendre le mécanisme de fécondation.

Les taux de fécondation sont élevés en ICSI : 65 à 78 %, cependant toute ICSI ne permet pas un remplacement d'embryon, soit par échec complet de fécondation, soit par l'obtention d'embryon(s) de qualité insuffisante. Avec l'accès à l'ICSI en augmentation croissante depuis plusieurs années, la confrontation à l'absence de remplacement embryonnaire pose problème aux couples et à l'équipe d'AMP.

Dans une première partie, une revue de la littérature exposera les principaux paramètres clinico-biologiques conditionnant le résultat de l'ICSI. Seront évoqués les facteurs pris en compte lors de l'exercice actuel, ainsi que quelques pistes de la recherche, qui intégreront peut-être la pratique de demain.

Dans une seconde partie, une étude nancéenne portera sur l'étude de tentatives ayant conduit à une absence de remplacement embryonnaire en ICSI soit par un échec de fécondation soit par l'absence d'embryon de qualité permettant un remplacement, constituant le groupe des cas. Ce groupe de cas sera comparé à un groupe témoin ayant obtenu au moins un embryon permettant un remplacement.

Les critères clinico-biologiques pris en compte dans la pratique quotidienne seront analysés dans la population totale de l'étude, et comparés chez les cas et les témoins.

L'objectif principal de cette étude est d'identifier les principaux facteurs clinico-biologiques corrélés à l'absence de remplacement embryonnaire en ICSI.

Une fois identifiés, le but est de décrire la fréquence de ces paramètres au sein des groupes cas et témoins, de définir s'ils sont significativement associés au risque d'absence de remplacement embryonnaire en ICSI.

L'objectif secondaire est d'extraire, parmi ces paramètres, ceux sur lesquels le patient, le clinicien, le biologiste ou le technicien ont une incidence pour permettre une amélioration de la prise en charge en amont ou pendant la tentative d'ICSI.

Les résultats seront présentés puis discutés selon les données de la littérature et critiqués selon les limites de l'étude.

2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1. La technique de l'ICSI

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 ou 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, Intra-cytoplasmic Sperm Injection ou la micro-injection d'un spermatozoïde dans le cytoplasme ovocytaire.

2.1.1. Le matériel de l'ICSI

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

Le système d'injection comprend une pipette de 60 à 120 µm de diamètre externe et de 20 à 40 µm de diamètre interne et un dispositif extrêmement fin d'aspiration et de refoulement de l'ovocyte grâce à la présence d'air dans une tubulure reliée à la pipette de contention.

2.1.2. Préparation des gamètes pour l'ICSI

2.1.2.1. Préparation des ovocytes

Au recueil, les ovocytes se présentent dans un complexe cumulo-ovocytaire (CCO). Avant la réalisation de l'ICSI, il est indispensable d'éliminer les cellules du cumulus et de la corona radiata qui, d'une part, peuvent obstruer la pipette de contention, et d'autre part sont un obstacle physique à la visualisation du 1er globule polaire permettant d'apprécier la maturité nucléaire de l'ovocyte à injecter.

L'élimination des cellules du cumulus et de la corona radiata est réalisée en associant une action enzymatique brève par l'hyaluronidase à une action mécanique. Après un contact enzymatique qui doit être le plus bref possible, les ovocytes sont rincés dans une solution tampon puis placés en milieu de culture dans un incubateur à CO² à 37° avant la micro-injection.

2.1.2.2. Préparation des spermatozoïdes

Les techniques de préparation des spermatozoïdes varient en fonction des laboratoires et des caractéristiques initiales plus ou moins altérées des spermatozoïdes.

En ICSI, le souci simple mais primordial est de disposer d'autant de spermatozoïdes vivants qu'il y a d'ovocytes matures à injecter. En effet, le choix du spermatozoïde à injecter est délicat lorsque tous les spermatozoïdes sont immobiles. Cependant si le spermatozoïde est immobile mais vivant, c'est-à-dire avec toutes ses membranes intactes, les chances de fécondation sont similaires à celles d'un spermatozoïde mobile.

2.1.2.3. Préparation de la boîte de micro-injection

La micro-injection se déroule dans une petite boîte de Pétri contenant habituellement des gouttes centrales de polyvinylpurrolidone ou PVP (5 μ l) destinées à recevoir un aliquot (1 μ l) de la suspension de spermatozoïdes préparés ; des gouttes latérales (5 μ l) de milieu de culture sont destinées à recevoir isolément les ovocytes. Toutes ces gouttes sont recouvertes par de l'huile minérale préalablement équilibrée à 37° C et 5% de CO².

Si une absence totale de mobilité complique sérieusement le choix du spermatozoïde à injecter, une mobilité fléchante du spermatozoïde peut rendre aussi délicate sa manipulation. Pour faciliter ce geste technique, il a alors été proposé de placer les spermatozoïdes dans une solution visqueuse de PVP. Le PVP ralentit donc la progression des spermatozoïdes et ralentit le déplacement du fluide à l'intérieur de la micropipette ce qui diminue le volume de milieu déposé dans l'ovocyte lors de l'injection.

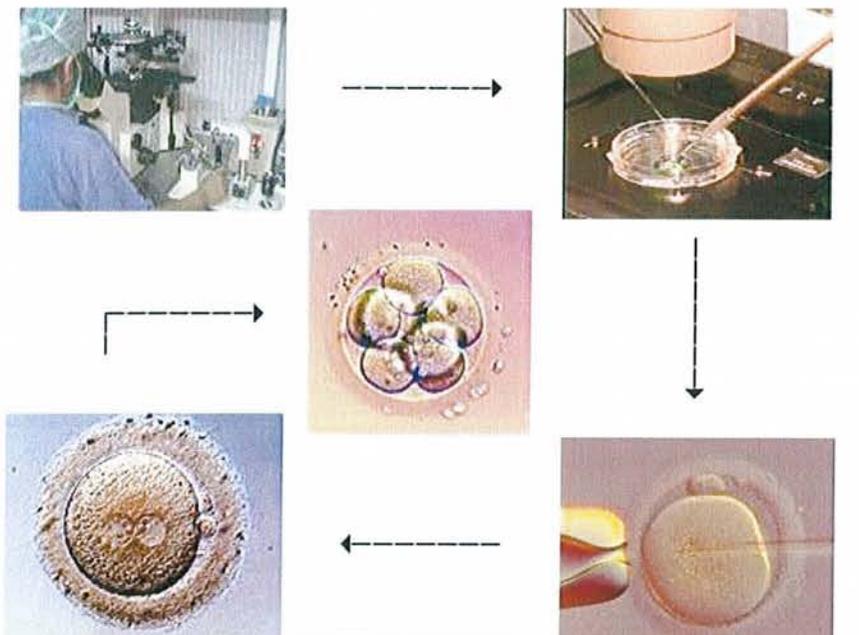


Figure 1 : Les étapes techniques de l'ICSI

2.1.3. Principales étapes du geste de micro-injection

2.1.3.1. Immobilisation du spermatozoïde

Le spermatozoïde mobile et de morphologie normale est immobilisé à l'aide de la micropipette 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 (figure 2-A).

2.1.3.2. Positionnement de l'ovocyte

L'ovocyte présent dans une goutte de milieu de culture est positionné au contact de la pipette de contention de telle manière à placer le 1er globule polaire à 6 heures ou 12 heures. Une aspiration délicate permet de maintenir fermement l'ovocyte, sans déformation de la membrane plasmique à la pipette de contention (figure 2-B). L'absence de globule polaire voire de présence d'une vésicule germinative et l'exclut donc de la micro-injection.

2.1.3.3. Dépôt du spermatozoïde dans l'ovocyte

Après immobilisation adéquate de l'ovocyte, la pipette de micro-injection est positionnée à 3 heures au contact et dans le même plan que l'ovocyte. Le spermatozoïde étant avancé à l'extrémité de la micropipette (pour injecter un volume minimal de milieu avec le spermatozoïde). 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 (figure 2-C). 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 (figure 2-D). A la fin de l'ICSI, les ovocytes sont rincés et placés en puits ou en goutte de milieu de culture puis incubés à 37°C et 5% de CO² jusqu'à l'observation du lendemain.

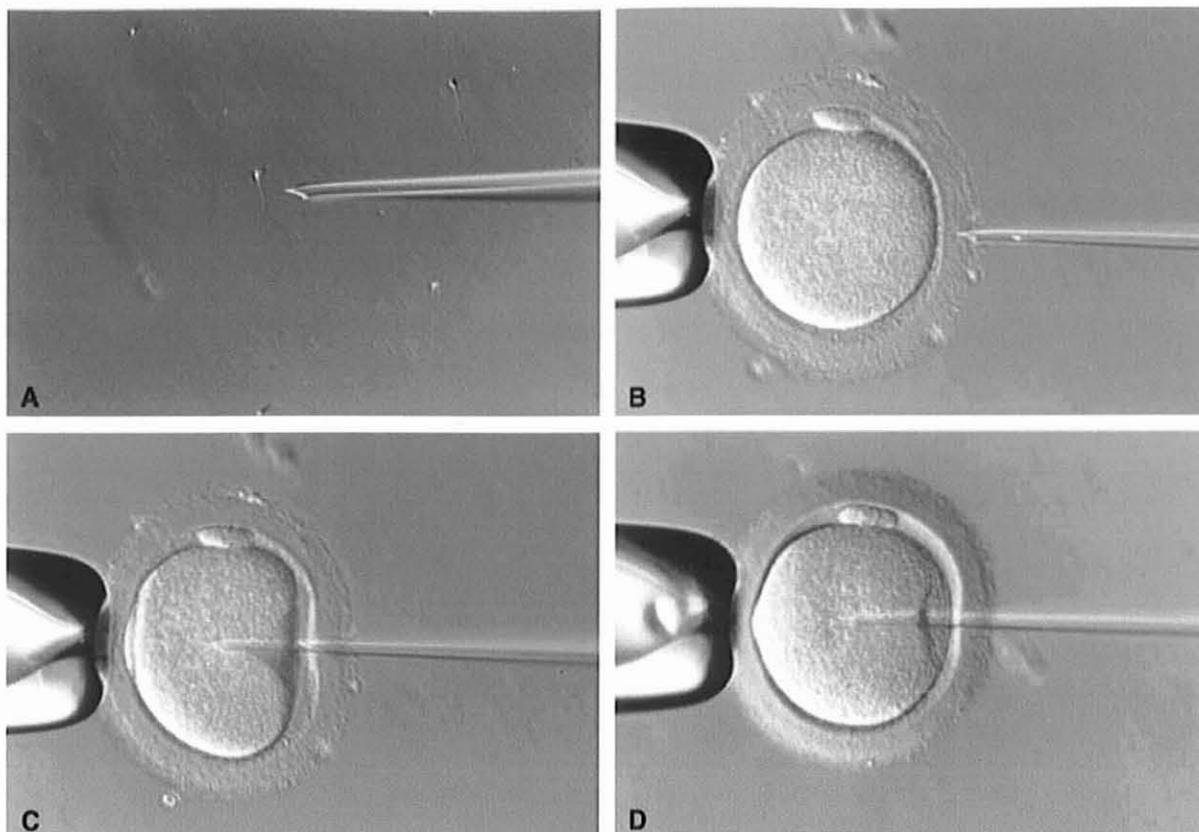


Figure 2: Le procédé de microinjection du spermatozoïde dans l'ovocyte décoronisé : l'ICSI. **A.** Un spermatozoïde est immobilisé après que son flagelle ait été touché par la pipette de microinjection. **B.** La pipette de microinjection transportant le spermatozoïde perce la zone pellucide. **C.** La pipette de microinjection déforme la membrane plasmique jusqu'à la rupture et aspire le cytoplasme. **D.** Le cytoplasme aspiré et le spermatozoïde sont délicatement replacés dans l'ovocyte.

2.2. Reflet de l'épidémiologie de l'ICSI en France

La prévalence de l'infertilité a été estimée en France à 14,1% des couples et en Europe à 14%. Selon une étude française, dans 20% des cas, l'infertilité est masculine, dans 34% des cas féminine, dans 39% des cas mixte, et dans 8% des cas indéterminée.

L'ICSI est classiquement réalisée en cas d'infertilité masculine. Les infertilités masculines sont principalement idiopathiques, associées à une varicocèle, secondaires à une infection ou immunitaires, de causes génétiques. La fréquence des anomalies génétiques dans les spermatozoïdes de patients présentant des troubles de la fertilité peut être voisine de celle observée dans la population masculine fertile (10%) ou être jusqu'à dix fois plus élevée.

D'après les données épidémiologiques et l'avis des experts des groupes de travail de la Haute Autorité de Santé de 2007, il ne paraît pas y avoir de variations importantes, en ce qui concerne les incidences d'infertilité et de pathologies génétiques ces dernières années.

Une augmentation de l'activité d'ICSI a été rapportée en France par l'European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), FIVNAT, l'Agence de la biomédecine et l'Assurance maladie, en Europe par l'ESHRE et aux Etats-Unis par le Center for Disease Control and Prevention (CDC). Cette augmentation se ferait au détriment de la FIV conventionnelle. L'ICSI représentait 22,3% des fécondations in vitro (FIV et ICSI) en 1995, 53% en 2002 (FIVNAT) et 57% en 2004 (Agence de la biomédecine). Le nombre d'ICSI augmente régulièrement au cours de ces dernières années et atteint 60 % de l'ensemble des fécondations in vitro en France selon le bilan de l'Agence de la biomédecine en 2006.

Une diminution de la réalisation de l'ICSI dans les indications masculines et une augmentation dans les indications non masculines a été rapportée. La réalisation de l'ICSI en contexte de diagnostic préimplantatoire (DPI) ne représentait en 2004 que 0,5% du volume d'activité totale de l'ICSI mais croîtrait de 15 à 20% par an, en raison de l'augmentation du nombre de pathologies détectables par DPI et de la diffusion de l'information aux couples. La réalisation de l'ICSI en contexte viral ne représenterait que 1,6% du volume d'activité de l'ICSI sans variation importante constatée.

L'analyse des données d'activité française (ABM) a montré entre 2003 et 2006 une efficacité globale de l'ICSI significativement supérieure à la FIV (20.3% versus 18.7%) en termes de taux d'accouchement par ponction. L'estimation du taux moyen de grossesse clinique par ponction, fondée sur les données de 2003 à 2006 de l'Agence de la biomédecine, était de 25,8% pour l'ICSI versus 24,3% pour la FIV, différence non significative. Le taux de grossesse clinique par ponction pour l'ICSI variait de 23,9 % à 27,1%, et pour la FIV de 22% à 24.3%. Le nombre moyen d'embryons transférés est en diminution en 2006 avec 2 embryons par transfert. On observe par ailleurs une diminution discrète et régulière des accouchements multiples. A noter que le taux d'embryons transférés et congelés, semble diminuer au cours des années et traduit une plus grande sélection pour le transfert ou la congélation. Le taux d'implantation de 16,1 % est comparable à celui observé en FIV hors ICSI.

2.3. Paramètres féminins influençant l'ICSI

2.3.1. Influence de l'histoire clinique

2.3.1.1. Age Maternel

La fertilité des femmes décroît avec l'âge dès 35 ans. Toutes les études s'accordent sur ce point.(1-12) Les techniques d'AMP voient leur taux de succès s'effondrer dès 37-38 ans (9-13). Selon l'Agence de biomédecine, une augmentation régulière et lente de l'âge des femmes en FIV et en ICSI a été constatée en France jusqu'en 2006. Mais au moment de la tentative d'ICSI, plus de 78 % des femmes ont moins de 38 ans en 2006.

En FIV, C Pipette et al, dans leur étude sur 5590 tentatives, montrent des taux de grossesse par tentative passant de 19.6% à l'âge de 25 ans à 9% à l'âge de 40 ans et plus.

Dès 40 ans (4, 6, 14, 15), les doses des traitements de stimulation sont significativement plus élevées et les durées de traitement plus longues. Le nombre d'ovocyte recueillis par ponction chute progressivement et le nombre d'embryons obtenu est plus faible.

L'âge maternel élevé semble être le principal facteur d'échec de fécondation en ICSI selon les études. (12-16). L'échec est essentiellement dû au vieillissement ovarien altérant la qualité ovocytaire, notamment la méiose ovocytaire. Selon Rosen (16), la fragmentation embryonnaire augmente avec l'âge de la patiente.

Cependant l'étude de Bar- Hava et al (15), sur un nombre d'ICSI total de 3360 ne retrouve pas d'impact de l'âge maternel sur la qualité de l'embryon en ICSI selon les critères morphologiques de taux de clivage, de taux de fragmentation, de taille et régularité des blastomères. Mais il retrouve un impact significatif de l'âge maternel sur la qualité de l'embryon en FIV classique.

2.3.1.2. La réserve ovarienne

Corrélée à l'âge de la femme, la réserve ovarienne est le reflet du vieillissement ovarien (2, 4, 17). La réserve ovarienne est évaluée par le **dosage concomitant à J2 ou J3** du cycle de la **FSH (12-14, 16), la LH, le 17 β Œstradiol** optimisé par le dosage de l'**Hormone Anti-Mullerienne (AMH)**. Il s'agit de paramètres très décrits et utilisés en pratique quotidienne.

Un taux de FSH de base supérieur à 10 ou 12 UI/L et une AMH inférieure à 2 (consensus) sont retenus comme péjoratifs. Il existe une variabilité inter-cyclique de la FSH. Si plusieurs dosages de FSH sont effectués, la valeur la plus péjorative de FSH est retenue comme facteur pronostique.

Le taux de base de LH à J3 modifie et améliore l'information apportée par le taux de base de FSH. Un taux de FSH bas ($< 6.7\text{U/L}$) associé à un taux élevé de LH ($> 4.9\text{U/L}$) reflète très probablement mieux la qualité de la réserve ovarienne et est associée à de meilleurs taux de succès en FIV- ICSI en terme de grossesse (18).

L'AMH est, quant à elle, constante tout au long du cycle et présente une moindre variabilité inter-cyclique (17). L'AMH est un meilleur reflet du statut folliculaire ovarien par rapport aux hormones plus classiquement utilisées. L'AMH peut être envisagée comme un marqueur quantitatif et potentiellement qualitatif de la qualité et de l'activité des cellules de la granulosa.

Le taux d'AMH est un outil utile de prédiction de la réponse ovarienne à la stimulation qui est reflété non seulement par la taille du pool de follicules primordiaux mais aussi par la qualité des ovocytes. Ebner et al. (19), dans leur étude, retrouvent que les taux d'annulation des cycles de stimulation sont corrélés au taux d'AMH ($P < 0.05$). Chez les patientes des groupes d'études correspondant aux valeurs extrêmes d'AMH ($< 1.66\text{ng/mL}$ et $> 4.52\text{ng/mL}$) sont retrouvés des ovocytes moins bonne qualité (granulation cytoplasmique, agrégation du réticulum endoplasmique lisse) comparés à ceux du groupe médian (AMH entre 1.66 et 4.52 ng/mL).

La valeur de l'AMH a une valeur supérieure au taux de FSH à J3 (15, 16) pour prédire le nombre et la qualité des ovocytes prélevés mais ne semble pas avoir d'impact sur la fécondation des ovocytes et l'évolutivité des embryons.

Ces dosages, effectués en général chez les femmes de plus de 38 ans, ne doivent pas être seuls responsables d'une absence de prise en charge, mais s'accompagnent d'un test de réponse ovarienne aux gonadotrophines, c'est-à-dire d'une 1^{ère} tentative de stimulation, en cas d'indication d'ICSI. Une faible réserve ovarienne augmente le risque de prolonger les traitements de stimulation, de majorer les doses de gonadotrophines, mais aussi le risque de ponctions blanches et d'absence d'embryons transférables.

L'inhibine B a un intérêt controversé, son utilisation est fonction des équipes.

2.3.1.3. Pathologie féminine

2.3.1.3.1. *L'obésité*

L'obésité est un problème croissant de notre société occidentale. En ce qui concerne la population féminine, 9 à 25% souffrent d'une obésité sévère dans les pays développés. En France en 2006, étaient concernés 13% des femmes et 9.8% des hommes. Elle est associée

chez la femme (20) à une augmentation de l'infécondité, des troubles ovulatoires, de l'hirsutisme, des fausses couches et des complications obstétricales. L'obésité androïde (rapport taille/hanche supérieur à 0.85) est plus particulièrement corrélée à l'hypofertilité, vraisemblablement corrélée au syndrome métabolique (augmentation de la triglycémie, du rapport cholestérol total/ HDL-cholestérol, de la glycémie, de l'insulinémie, de la résistance à l'insuline, des transaminases).

L'ovaire soumis aux traitements de stimulation pour l'ICSI ne joue pas un rôle exclusif. L'environnement endocrinien et métabolique peut affecter la qualité de l'ovocyte et le développement embryonnaire. De même lors de l'implantation, cet environnement endocrinien et métabolique défavorable peut agir sur l'endomètre et influencer sur le déroulement de la grossesse. En outre, l'obésité semble avoir des répercussions sur la fonction reproductive dans la descendance des femmes, probablement par le biais d'altérations métaboliques induites chez les enfants (21).

2.3.1.3.1.1. Liens physiopathologiques entre l'obésité et l'infertilité

Des modèles murins attribuent l'anovulation, dans le cadre de l'obésité, à un hypogonadisme hypothalamique, consécutif à une hyperleptinémie relative à une insulino-résistance (22). Dans l'espèce humaine, des altérations du métabolisme cellulaire ont effectivement été constatées. Au niveau du métabolisme lipidique, en particulier stéroïdien, on retrouve un hyperandrogénisme avec une diminution de la sex hormone binding globulin (SHBG), au niveau du métabolisme glucidique, une hyperinsulinémie avec insulino-résistance. Concernant le métabolisme protidique, la sécrétion des leptines et des adiponectines augmente.

Dans la population féminine obèse en âge de procréer, les troubles hypothalamiques observés correspondent à ceux constatés chez l'animal, à savoir un profil évocateur d'hypogonadisme central : diminution des taux de FSH, LH et d'inhibine B. Cependant en cas de syndrome des ovaires polykystiques associé, les troubles sont ceux habituellement constatés à savoir une augmentation de la LH relative à la FSH, indépendamment de l'IMC. Ces altérations semblent être dues à une stimulation centrale sérotoninergique inadéquate, une stimulation dopaminergique excessive, ou une insensibilité aux endorphines.

L'obésité androïde, généralement associée à un état d'insulino-résistance avec hyperinsulinisme, est vraisemblablement responsable d'une surstimulation de la stéroïdogénèse ovarienne insulino-médiée. Ces modifications entraînent un hyperandrogénisme, aggravé par la diminution de la SHBG plasmatique, et une hyperoestrogénie par le biais de l'aromatase (23).

Le pronostic d'une prise en charge en AMP est variable selon les données de la littérature : une étude portant sur des patientes en insémination intra-utérine (IIU) a rapporté une augmentation de la fertilité des patientes en surpoids ou obèses par rapport aux patientes dont l'IMC est normal (24). Certaines études menées sur des femmes suivies en AMP n'ont pas montré de différence significative entre les différentes classes d'IMC (23-26).

D'autres études telles que celle de Lintsen (27) permettent de constater que le taux de succès chez les patientes obèses est moindre que chez les femmes dont l'IMC est normal, 38 % chez les patientes à IMC > 32 versus 58 % si l'IMC < 32 (26) ; OR du taux de grossesse vivante en fécondation in vitro, protocole classique et ICSI, en cas d'IMC > 27 = 0,67 (0,48–0,94)

2.3.1.3.2. Influence du syndrome des ovaires polykystiques sur la qualité ovocytaire

2.3.1.3.2.1. Définition du SOPK

Selon les critères de Rotterdam, le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) est défini par la coexistence de 2 critères sur les 3 suivants : l'oligo-anovulation, l'hyperandrogénie clinique et/ ou biologique, la présence de critères échographiques comprenant 10 à 12 follicules ovariens répartis en couronne avec un stroma dense.

Le SOPK est caractérisé par une production excessive de follicules et d'ovocytes. La question de la qualité de ces ovocytes reste ouverte.

Dans la genèse des troubles endocriniens et de la croissance folliculaire qui caractérisent le SOPK, le rôle de certains facteurs d'origine ovocytaire a été mis en évidence (28). Le concept que l'ovocyte puisse être à l'origine des troubles de la folliculogénèse paraît plausible.

La fertilité des femmes présentant un SOPK ne se limite pas à la seule anovulation. Les études récentes indiquent que le taux de fertilisation des ovocytes issus de femmes présentant un SOPK est comparable à celui des femmes normo-ovulantes.

Mais la survenue de fausses-couches à répétition chez ces femmes pourrait refléter une altération de la qualité ovocytaire ou être le reflet d'un environnement endocrinien peu favorable à l'endomètre ou aux facteurs d'adhésion embryonnaires. Or, la relation entre les fausses-couches à répétition et SOPK est particulièrement étroite : 36 à 56% des femmes présentant des fausses-couches à répétition sont affectées par un SOPK. Chez les patientes présentant un SOPK, la coexistence d'une obésité majeure cet état d'hyperandrogénie et les troubles métaboliques, altère la régularité des cycles en augmentant les spanioménorrhées, celle de l'ovulation, et réduit les chances de grossesse. Les femmes porteuses d'un SOPK présentant des fausses-couches à répétition ont des taux d'androgènes élevés et une

prévalence élevée d'insulino-résistance. Ces données témoignent d'une probable relation entre l'environnement métabolique et/ou hormonal et la qualité des ovocytes ou celle de la fenêtre d'implantation embryonnaire endométriale des patientes présentant un SOPK.

2.3.1.3.2.2. Maturation ovocytaire et génétique de l'ovocyte chez les SOPK

L'analyse de l'expression des gènes ovocytaires chez les femmes atteintes de SOPK a été rapportée dès le début des années 2000 (28), avec une attention particulière pour GDF9 (Growth Differentiation Factor 9), facteur d'origine ovocytaire impliqué à la fois dans la prolifération des cellules de la granulosa et dans la production des androgènes par la thèque interne. Ainsi l'observation d'une diminution de l'expression de GDF 9 par les ovocytes de SOPK est en accord avec le rôle potentiel des ovocytes sur la croissance folliculaire et la stéroïdogénèse ovarienne.

La relation entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa impliquant GDF 9 mais aussi BMP 15 (Bone Morphogenic Protein 15) montre l'implication des facteurs d'origine ovocytaire dans la régulation de nombreuses fonctions folliculaires, en particulier l'expression du récepteur de la LH (29).

Des différences significatives du transcriptome ont été mises en évidence entre les ovocytes normaux et ceux des patients SOPK (30). L'expression de certains gènes impliqués dans la méiose et la dynamique chromosomique est modifiée. On ne sait s'il s'agit d'une anomalie primaire de l'ovocyte ou s'il s'agit d'une anomalie induite par une altération de l'environnement endocrinien. Bien qu'il existe des arguments qui témoignent de liens familiaux dans la genèse du SOPK, aucune preuve suffisante ne permet d'établir une liaison héréditaire entre les gènes spécifiques de l'ovocyte et le SOPK. Cependant il n'y a pas de preuve à ce jour que les chromosomes des ovocytes de SOPK soient altérés. Les perturbations du transcriptome ne peuvent être tenues pour responsable de désordres chromosomiques. Ces données attestent ainsi de l'intérêt de la recherche en biologie moléculaire dans l'analyse des désordres ovocytaires.

2.3.1.3.3. Qualité ovocytaire lors du syndrome d'hyperstimulation

Dans son étude, Fabrègues (31) a évalué la qualité des ovocytes de patientes porteuses d'un syndrome d'hyperstimulation ovarienne sévère (HSO) sur une période de 10 ans. Le nombre total d'ovocytes recueillis est significativement supérieur par rapport à une population témoin, notamment le nombre d'ovocytes en métaphase II. Les taux de fécondation en FIV et ICSI

sont comparables et en conséquence, le nombre d'embryons est supérieur en cas d'hyperstimulation. Les taux d'implantation et de grossesse sont similaires dans les deux groupes. Le rendement ovocytaire et embryonnaire ainsi que la qualité est comparable en cas d'hyperstimulation précoce ou tardive. Le rendement de l'ovocyte et sa qualité, le devenir de l'embryon, les taux d'implantation et de grossesse sont comparables lors des cycles HSO et témoins. L'hyperstimulation ovarienne n'altère pas dans cette étude la qualité ovocytaire.

Cependant, des études comme celle de Xia (64) ont suggéré que le taux de dégénérescence ovarienne est supérieur lorsque la ponction retrouve plus de 20 ovocytes et que le taux d'œstradiol dépasse 3000 pg/mL le jour du déclenchement. Cela peut sembler contradictoire, mais Xia ne retrouve pas de différence au niveau de la qualité des embryons malgré le taux élevé de dégénérescence ovocytaire.

2.3.1.3.4. Endométriose

Au total, 25 à 50 % des femmes infertiles ont une endométriose et 25 à 50 % des patientes endométriosiques sont infertiles. Il est admis que l'endométriose et l'infertilité sont associées.

2.3.1.3.4.1. Définition

L'endométriose externe, définie par la présence de tissu endométrial en position ectopique est une affection multifactorielle dont l'étiopathogénie est, aujourd'hui encore, mal élucidée (32). Cette pathologie présente un grand polymorphisme clinique et morphologique. L'évolution est peu prévisible et très variable d'une patiente à l'autre. Plusieurs mécanismes pouvant réduire la fertilité ont été exposés mais aucun n'a fait réellement sa preuve.

2.3.1.3.4.2. Mécanismes lésionnels de l'endométriose

Non seulement, les lésions endométriosiques sévères sont responsables d'infertilité tubaire par la présence de séquelles inflammatoires tubaires, d'adhérences péritubaires ou périovariennes ou d'endométriomes, mais aussi, lors de lésions d'endométriose superficielles, des mécanismes plus complexes surviennent à différents stades : folliculogenèse, ovulation, fécondation, qualité de l'embryon et implantation.

Des études ont montré des altérations de l'environnement péritonéal: élévation de la concentration des cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-12, IF, TNF), des macrophages et des prostaglandines (33, 34)(33-36), augmentant le stress oxydatif. Ces modifications biochimiques ont des actions néfastes sur l'ovocyte, les spermatozoïdes, l'embryon et le fonctionnement tubaire.

L'endométriase entraînerait des altérations de la réponse immunitaire locale en augmentant les taux de lymphocytes et d'anticorps IgG et IgA au sein de l'endomètre, ce qui aurait des répercussions sur la réceptivité endométriale et sur l'implantation embryonnaire (35). Des sécrétions d'anticorps anti-zone pellucide ont été rapportées.

L'endométriase pourrait entraîner des altérations des fonctions endocrine et ovulatoire de l'ovaire: dysfonction de la phase lutéale, anomalies de la croissance folliculaire, pics de LH prématurés ou multiples. Plusieurs auteurs ont rapportés un défaut de régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire et ovarien, mis en évidence par des taux de progestérone plus faibles et altération du corps jaune.

L'endométriase entraîne des altérations des mécanismes d'implantation au sein de l'endomètre en réduisant l'expression des intégrines α et β au sein de l'endomètre ou en intervenant dans l'interaction trophoblaste-blastocyste (36).

2.3.1.3.4.3. Altérations qualitatives de l'ovocyte et de l'embryon

Des études des marqueurs biologiques et moléculaires du développement des ovocytes et de la qualité de l'embryon ont pu être effectuées en comparant les patientes avec et sans endométriase. Dans une étude comparative, le nombre d'ovocytes ponctionnés, le taux de fécondation et le nombre de blastomères à 48 heures étaient identiques avec ou sans endométriase (37). En revanche, après 72 heures, il existait un nombre de blastomères plus faible dans le groupe endométriase. Sur des observations *in vitro*, d'autres auteurs ont également montré que le pourcentage d'embryons anormaux était plus important en présence d'une endométriase. Brizek et al. ont analysé 235 embryons issus de 56 cycles de FIV. Dans le groupe endométriase, plusieurs anomalies cytoplasmiques et nucléaires ont été observées au cours du développement embryonnaire (38). Au total, il semble que la qualité de l'embryon soit plus faible en présence d'une endométriase, reflétant une qualité ovocytaire également plus faible.

2.3.1.3.4.4. Endométriase, FIV Classique et ICSI

La stratégie thérapeutique est à adapter en fonction de l'âge de la patiente, du stade de l'endométriase, de la durée de l'infertilité, de l'association à une symptomatologie algique.

Concernant l'influence des endométriomes sur les résultats de la FIV, la littérature rapporte plusieurs études (39, 40)(42, 43). Aucune différence significative n'est notée au sujet des paramètres suivants : nombre d'ovocytes recueillis, taux de grossesse, taux d'accouchement. Cependant la présence d'endométriomes oblige à des doses de gonadotrophines plus élevées,

une stimulation plus longue. Au total il semble que l'impact d'un endométriome sur les résultats de la FIV soit faible.

Dans un contexte d'endométriose, différents paramètres compliquent la prise en charge: réponse ovarienne variable après stimulation surtout en présence d'un endométriome ou en cas d'altération de la réserve ovarienne suite à une kystectomie itérative (40) ; réduction de la qualité de l'ovocyte et de l'embryon et réduction des capacités d'implantation de l'endomètre.

L'efficacité de la FIV dans ce contexte a été évaluée dans plusieurs études. Les résultats semblent variables.

Tout d'abord, il semble que la réponse ovarienne à la stimulation soit moins bonne. La croissance folliculaire est le plus souvent plus lente, les posologies de stimulation plus importantes et le nombre d'ovocytes recueillis plus faible (41)(44, 45).

Olivennes et al. ont montré que le taux de grossesse après FIV était comparable dans un contexte d'endométriose isolée (n = 214) ou dans un contexte d'infertilité tubaire (n = 111) quelque soit le stade (42). À l'opposé, Aboulghar et al. ont montré que les résultats de la FIV étaient significativement plus faibles chez les patientes présentant une endométriose de stade IV avec un antécédent de traitement chirurgical par rapport à un groupe témoin de patientes présentant une infertilité tubaire (43).

La FIV classique et ICSI, dans un contexte d'endométriose fait l'objet d'une méta-analyse regroupant 22 études. Le taux de grossesse était significativement plus faible dans un contexte d'endométriose que dans un contexte de stérilité tubaire (odds ratio : 0,56). Une analyse multivariée montrait également que les taux de fécondation, de réimplantation et le nombre d'ovocytes étaient significativement plus faibles dans un contexte d'endométriose. Cette différence est encore plus marquée dans le groupe des endométries sévères (stades III-IV) (44). Cependant ces résultats sont à prendre avec le recul nécessaire : l'étude inclut des séries assez anciennes, les séries sont très hétérogènes en particulier pour les groupes témoins.

2.3.1.3.4.5. Les résultats des études sont controversés en matière de résultats de l'ICSI vis-à-vis de l'endométriose.

Si l'on s'en tient aux différentes séries comparatives, il est difficile de conclure tant les avis divergent aussi bien pour le résultat global en taux de grossesse par tentative que pour les différentes étapes : nombre d'ovocytes, taux de fécondation, taux d'implantation.

2.3.1.3.5. Influence du tabac

La connaissance du rôle délétère du tabac sur la fonction reproductive s'améliore constamment.

Dans leur étude prospective de 1977 à 1982, comprenant 1882 couples, De Mouzon et al (45) ont retrouvé une diminution des taux de grossesses spontanées, lorsque les deux membres du couple sont fumeurs.

Maintenant, on sait que le temps à concevoir en fertilité naturelle est plus long, la fréquence de l'infécondité est augmentée, le taux de fertilité décline de 10 à 20% avec un effet dose-dépendant. Même les femmes ayant été exposées in utero au tabac ont une fertilité moindre. Les fumeuses sont plus à risque de troubles menstruels et de ménopause précoce.

En AMP l'effet nocif du tabac a été clairement démontré : taux d'œstradiol inférieurs, chute des taux d'implantation et de grossesse, altération des critères morphologiques de l'ovocyte. Les deux méta-analyses publiées ont conclu que ces effets délétères persistent malgré les techniques de l'AMP(46).

Les femmes doivent être informées de l'effet néfaste de la cigarette sur leur fertilité. Le rôle éducatif médical doit être prépondérant, surtout dans des pays comme la France où le pourcentage de fumeurs augmente chez les femmes et particulièrement les femmes jeunes.

2.3.2. Morphologie et qualité ovocytaire

Actuellement, les équipes clinico-biologiques sont confrontées quotidiennement à l'évaluation de la qualité de l'ovocyte dont l'aspect morphologique est l'un des critères.

La littérature à ce jour atteste de la corrélation entre l'aspect morphologique de l'ovocyte et le développement embryonnaire et/ou les chances de grossesse (47-49). Aucun critère morphologique n'a pu à ce jour être clairement associé à la qualité fonctionnelle de l'ovocyte.

L'hyperstimulation ovarienne contrôlée a pour but d'obtenir des ovocytes dont la capacité à devenir un embryon avec un potentiel de développement durable. La mesure du taux d'œstradiol plasmatique et de la taille du follicule permet de déclencher l'ovulation dans des conditions suffisantes pour recueillir des ovocytes matures, mais en aucun cas, n'apporte la preuve de la compétence des ovocytes. La maturation finale des ovocytes concerne à la fois le cytoplasme qui prépare l'ovocyte à son activation et à sa fertilisation par notamment la libération de calcium et de glutathion, et la noyau avec reprise de la méiose et progression vers le stade de métaphase II.

Ainsi le noyau et le cytoplasme ont fait l'objet d'études morphologiques. Certains traits morphologiques semblent associés à un pronostic de compétence plus réservé.

2.3.2.1. Mesures de l'ovocyte

Un ovocyte de plus de 200 µm de diamètre, dit « géant », est un événement rare qui contribue à risque significatif de trisomie génique(50). Les embryons issus de ces ovocytes peuvent se développer jusqu'au stade blastocyste mais causent ensuite des fausses-couches.

2.3.2.2. Viscosité du cytoplasme

La viscosité du cytoplasme peut être appréciée lors de la micro-injection par sa résistance et sa tendance à coller à la pipette lors de la microinjection. Une étude d'Ebner et al.(51) suggère que l'augmentation de sa viscosité est associée à une qualité embryonnaire diminuée avec une faible capacité à l'implantation et à mener une grossesse à terme. Cette hyperviscosité est un marqueur pronostic négatif, quoi que subjectif, du développement embryonnaire préimplantatoire.

2.3.2.3. Aspect granuleux du cytoplasme

Selon une autre étude d'Ebner et al., l'aspect granuleux du cytoplasme de l'ensemble des ovocytes serait observé dans 8% des cycles(47). Dans ces conditions, le taux d'implantation est significativement réduit (4.3%) ainsi que le taux de grossesse évolutif (12.8%). Ceci serait corrélé à un taux d'aneuploïdie particulièrement élevé (52.3%).

L'agrégation du réticulum endoplasmique lisse est observée dans 6.2 à 9.4% des cycles (47). Sa présence semble diminuer légèrement la fertilisation en ICSI (58.9 % versus 77.4% dans le groupe contrôle, $P < 0.001$) mais est surtout corrélée à un taux de grossesse biochimique élevé, à un mauvais pronostic obstétrical et à un faible poids à la naissance. Cette anomalie morphologique récemment rapportée par Ebner ne paraît pas liée au protocole utilisé, à l'âge ou une endométriose mais une corrélation avec le taux d'œstradiol plasmatique, la dose de gonadotrophine et la durée du traitement de stimulation a été rapportée.

Ebner et son équipe, en conséquence, recommandent d'éviter le remplacement d'embryon ou de blastocystes issus d'ovocytes ayant présenté une agrégation du réticulum endoplasmique lisse.

2.3.2.4. Les vacuoles cytoplasmiques

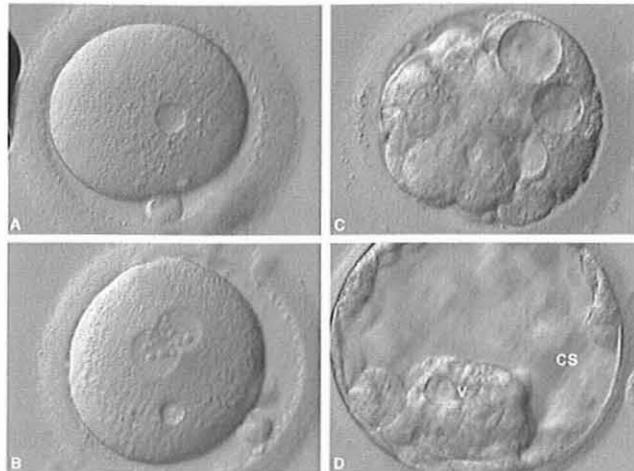


Figure 3 : La vacuolisation au cours du développement. *Fertility & Sterility 2005*

(A) Vacuole (17 μ m) dans un ovocyte en Métaphase II ; (B) Vacuole de 10 μ m au stade zygote ; (C) Embryon en cours de compaction avec une vacuolisation sévère (22 à 35 μ m) ; (D) Vacuole de 17 μ m dans le bourgeon cellulaire du blastocyste expansé (V) ; (CS) = cytoplasme.

Les vacuoles cytoplasmiques sont la conséquence d'inclusions à partir de la membrane cytoplasmique et contiennent un fluide dont la composition est identique à celle du fluide péri-vitellin. Leur apparition serait concomitante à l'expulsion du 1^{er} globule polaire.

Les conséquences de leur présence sont souvent débattues. Selon Ebner et al. (48), 3.9% des ovocytes en métaphase II auraient au moins une vacuole. Le taux de fécondation en ICSI de ces ovocytes est significativement diminué (48.9 versus 65.3%) lors de la présence de ces vacuoles. Un seuil de 14 μ m de diamètre de la vacuole a été retrouvé au-delà duquel aucune fécondation n'est observée. De plus, le taux de développement de l'embryon vers le stade blastocyste, corrélé à la présence de vacuoles, est significativement réduit.

2.3.2.5. Ovocyte et fuseau méiotique

2.3.2.5.1. *L'étude du fuseau méiotique*

L'identification du fuseau de métaphase de deuxième division méiotique des ovocytes est possible en raison de la biréfringence spontanée du fuseau en lumière polarisée.

Le fuseau méiotique joue un rôle important dans l'ovocyte pendant l'alignement des chromosomes et leur séparation lors de la méiose. L'altération du fuseau méiotique augmente les risques de mal-ségrégation des chromosomes.

Les anomalies du fuseau augmentent avec l'âge de la femme au-delà de 40 ans (52), ce qui est un facteur contributif d'aneuploïdie chez les embryons et facteur d'échec de développement embryonnaire.

L'étude non-invasive au microscope à lumière polarisée (PolScope) du fuseau méiotique a été effectuée par de nombreuses équipes.

L'étude Shen et al. (53) reconnaît l'exploration de l'imagerie du fuseau méiotique en lumière polarisée de cette étude comme facteur prédictif de la qualité ovocytaire. Elle est liée au score des pronucléi et de l'embryon et peut être particulièrement utile pour évaluer la qualité des ovocytes.

La biréfringence du fuseau méiotique semble associée au potentiel de fertilisation après ICSI selon Wang et al. Ils expliquent la possibilité que les ovocytes sans biréfringence du fuseau méiotique puissent avoir d'abondantes anomalies chromosomiques qui induiraient l'arrêt du cycle cellulaire. Ils suggèrent également que les changements dans la structure du fuseau puissent être le reflet de dysfonctions cytoplasmiques ou d'autres altérations ovocytaires.

2.3.2.5.2. Position du fuseau méiotique

La localisation du 1^{er} globule polaire situe théoriquement la position du fuseau méiotique. L'orientation obligatoire du biseau de la micropipette vers le bas a pour conséquence de rendre le plus proche du fuseau le spermatozoïde lorsque le 1^{er} GP est positionné à 6H plutôt qu'à 12 H. Il a été montré que dans cette situation, le taux de fécondation, le nombre d'embryons transférables et le taux de grossesse étaient améliorés. Cette proximité du spermatozoïde et du fuseau de division pourrait faciliter les premières divisions de l'ovocyte après fécondation. Si une étude a montré que la majorité des fuseaux métaphasiques se trouvent dans le même hémisphère que le 1^{er} globule polaire (54).

Cependant il a été montré avec l'aide du Polscope que la position du 1^{er} GP était un indicateur imparfait de la localisation du fuseau. Ainsi la technique du Polscope pourrait être utilisée pour positionner correctement l'ovocyte avant la micro-injection afin de réduire les risques de lésions du fuseau pouvant être à l'origine d'aneuploïdie (55).

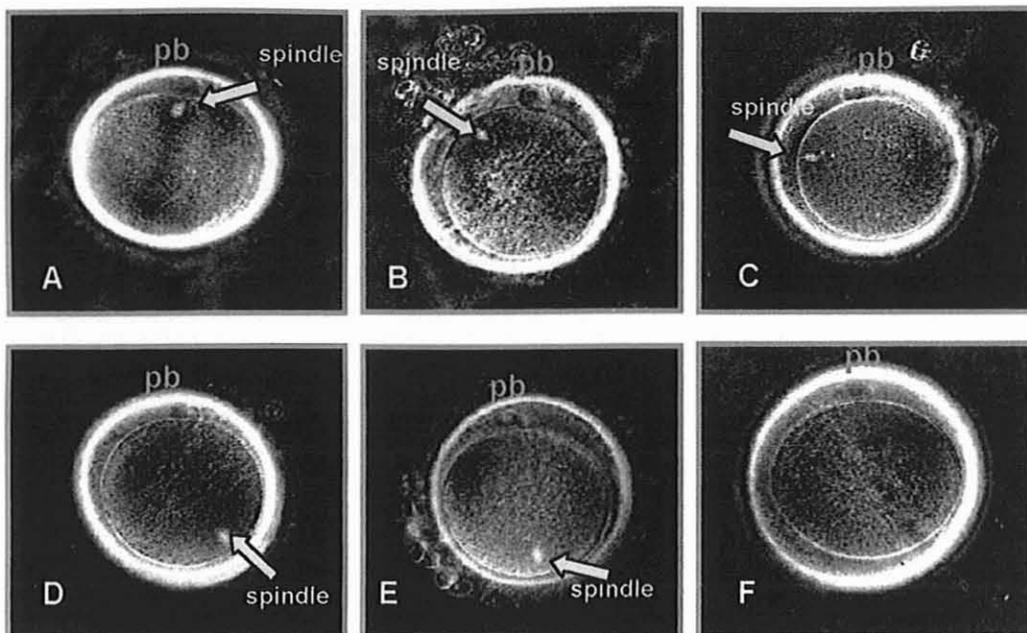


Figure 4: Etude de Moon. Human Reproduction en 2003. Fuseau bi-réfringent chez l'ovocyte humain vivant en métaphase II avec le Polscope juste avant l'ICSI.

- (A) Ovocyte avec le fuseau localisé sous le 1er globule polaire (pb). (B) Ovocyte avec le fuseau localisé entre 0° et 60° par rapport au globule polaire. (C) Ovocyte avec le fuseau localisé entre 60° et 120° . (D) Ovocyte avec le fuseau localisé entre 120° et 180° . (E) Ovocyte avec le fuseau localisé exactement à 180° du globule polaire. (F) Ovocyte sans fuseau méiotique visualisé. Grossissement x 200.

Devant la variabilité de position des fuseaux méiotiques, l'équipe de Moon et al. en 2003 a tenté d'établir si celle-ci avait un impact sur l'issue de l'ICSI.

2.3.2.5.3. Repérage de la position du fuseau et ICSI

L'étude de Moon et al. (56) a évalué la compétence embryonnaire, selon les positions variables du fuseau méiotique chez l'ovocyte et chez l'ovocyte avec un fuseau non visible, après ICSI. Leur étude démontre que la présence d'un fuseau méiotique biréfringent au niveau de l'ovocyte en utilisant le microscope à lumière polarisée, le Polscope peut prédire une meilleure compétence embryonnaire au développement. Le polscope permettrait aussi de vérifier la stabilité des microtubules de tubuline consécutifs du fuseau. En effet la stabilité du fuseau, permise par un contrôle thermique rigoureux au cours de l'ICSI améliore les taux de fécondation et de grossesse (57). Cependant, la position du fuseau au sein de l'ovocyte ne semble pas influencer le potentiel de développement embryonnaire.

L'étude récente de Madashi et al. (58) retrouve une corrélation positive entre la biréfringence de la zone pellucide et la visualisation du fuseau méiotique.

De plus, une fois le fuseau méiotique observé, le taux de fécondation des ovocytes à faible ou forte biréfringence de la zone pellucide est similaire. Les taux d'implantation et de grossesse ont été significativement plus élevés lorsque les embryons issus d'ovocytes de haute biréfringence étaient exclusivement transférés ($p=0,041$ et $p=0,004$, respectivement). En outre, le taux de fausse couche est plus élevé lorsque les embryons résultant d'une faible biréfringence ovocytes étaient exclusivement transférés. D'autre part, la dose totale de FSH élevée affecte négativement la visualisation du fuseau méiotique. Leurs résultats montrent que la sélection des embryons basée sur la zone pellucide et l'imagerie du fuseau méiotique peuvent sensiblement améliorer l'implantation et le taux de grossesse.

Les conséquences du repérage et de la localisation du fuseau sur la fécondation et surtout le développement embryonnaire ont été confirmées, de même que l'impact de l'anisotropie de la zone pellucide des ovocytes vis-à-vis de la lumière polarisée particulièrement pour la couche la plus interne.

2.3.2.6. Autres critères additionnels de développement précoce

Les restrictions imposées par la législation dans certains pays (Allemagne, Suisse, Italie) ont paradoxalement stimulé les recherches de critères additionnels de développement précoce (59).

D'autres aspects dysmorphiques tels que la **granulosité de l'espace péri-vitellin**, l'épaisseur ou l'irrégularité de la **zone pellucide**, la présence de **corps réfractaires**, **l'aspect ovoïde** de l'ovocyte ou des embryons ont également été associés à un moins bon pronostic de fertilisation ou de développement embryonnaire.

Xia et al. (60) ont montré que le classement des ovocytes selon ces 3 critères : l'aspect de leur 1^{er} globule polaire, la mesure de l'espace péri-vitellin et la présence d'inclusions cytoplasmiques est corrélé au taux de fertilisation des ovocytes et à la qualité embryonnaire après ICSI.

La **morphologie du 1^{er} globule polaire** a aussi été proposée comme possible indicateur de fécondation et de qualité embryonnaire en ICSI. Ebner et al. en 2000 (49) retrouvent, lors de leur étude rétrospective, de meilleurs taux de fécondation et une meilleure qualité embryonnaire en ICSI, lors de l'utilisation d'ovocytes ayant montrés un 1^{er} globule polaire intact et bien formé.

Cependant des études plus récentes ont échoué à démontrer cette corrélation entre la fragmentation du 1^{er} globule polaire et la qualité embryonnaire ainsi que le taux d'implantation embryonnaire. De plus, il a été démontré que le taux d'aneuploïdie des ovocytes en métaphase II n'est pas corrélé à la morphologie de leur 1^{er} globule polaire.

Ces études donnent des indications indirectes sur la qualité des ovocytes et certaines équipes tentent d'établir des **scores**.

La législation italienne limite la fécondation ovocytaire à trois par tentative. Les équipes italiennes se sont penchées avec d'autant plus d'intérêt sur la question de la sélection ovocytaire. Notamment l'étude de Rienzi en 2008 (50) a travaillé sur une classification morphologique des ovocytes et a cherché à définir un score, **le MetaII oocyte morphologic score ou MOMS**, capable de prédire la compétence ovocytaire en terme de potentiel de fécondation, de morphologie des pronuclei et de capacité à un développement embryonnaire.

2.3.3. La génétique de l'ovocyte

Le terme de génétique de l'ovocyte englobe 3 grandes parties que sont :

- les anomalies chromosomiques ovocytaires à l'origine d'aneuploïdies embryonnaires,
- les mécanismes génétiques de la maturation ovocytaire,
- les facteurs génétiques de prédisposition aux atteintes ovariennes ou de la réponse ovarienne.

2.3.3.1. Les anomalies chromosomiques ovocytaires

Le taux d'échec du développement embryonnaire est très important dans notre espèce avec une cause majoritairement chromosomique. Il est admis qu'un organisme ne peut vivre avec un déséquilibre de plus de 1% de son génome en cas de monosomie et de 3% en cas de trisomie(61).

L'origine parentale de ces non-disjonctions chromosomiques a pu être déterminée grâce à l'existence de nombreux polymorphismes génétiques. Plusieurs équipes ont pu démontrer la forte prévalence de l'origine maternelle de ces anomalies de nombre, qui surviennent essentiellement lors de la première division méiotique (Métaphase I). Ainsi, 93% des trisomies 18, 95% des trisomies 21 et 100% des trisomies 16 sont d'origine maternelle.

Puisque les anomalies chromosomiques relèvent, pour l'essentiel, de causes méiotiques, elles préexistent dans les ovocytes matures.

Aujourd'hui, la cytogénétique des gamètes constitue un domaine d'analyse cytogénétique à part entière et fournit des données essentielles pour l'étude de la transmission des anomalies

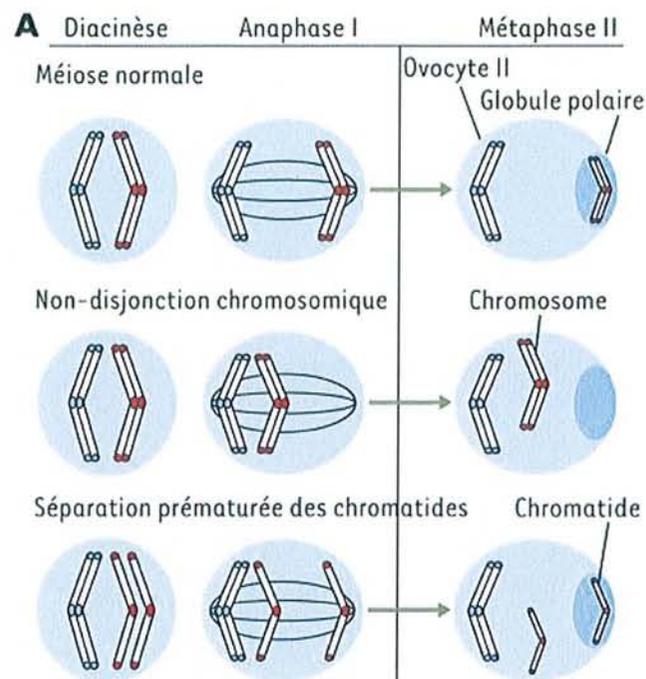
chromosomiques, de l'étiologie de ces anomalies chromosomiques et des mécanismes de la méiose. Les données actuelles font état de taux d'anomalies chromosomiques ovocytaires de 15 à 20% (61).

Ces études cytogénétiques ont mis en évidence l'existence d'un mode de non-disjonction jusqu'ici passé inaperçu dans le processus méiotique humain, à savoir la séparation prématurée des chromatides sœurs (SPCS) au cours de l'anaphase de la Métaphase I.

Ce type d'anomalie méiotique aboutit à la ségrégation aléatoire des chromatides libres au cours des 2 divisions méiotiques successives et peut ainsi conduire à la formation de trisomies.

Ce type de non-disjonction est en fait le mode majeur de non-disjonction opérant dans la méiose féminine (61). De plus, il semble que la SPCS soit liée de façon plus significative à l'âge de la patiente que la non-disjonction conventionnelle, avec une prépondérance des anomalies dans les chromosomes de petites tailles.

Figure 5 : Les non-disjonctions méiotiques ovocytaires. (Médecine Sciences juillet 2004)



B



- A.** Représentation schématique d'une 1ère division méiotique normale et de deux types de non-disjonction pouvant avoir lieu au cours de cette division. La non-disjonction chromosomique classique aboutit à la présence de deux chromosomes homologues dans la métaphase II, alors que la séparation prématurée d'une paire de chromatides se traduit par la présence d'une (ou de deux) chromatide(s) libre(s) dans la métaphase II.
- B.** Exemple d'une métaphase II présentant une chromatide libre (flèche). À noter l'aspect très particulier des chromosomes d'ovocytes rendant leur identification particulièrement délicate.

2.3.3.2. Analyse des globules polaires

Grâce au développement des techniques de sélection embryonnaires (PGS) ou ovocytaire par analyse des globules polaires (PCS) pour diagnostic préconceptionnel, différentes populations de patientes définies comme à haut risque d'aneuploïdes ont été identifiées. Il s'agit des femmes âgées de plus de 35 ans ou 38 ans, celles en échec d'implantation (après le transfert de 10 embryons sans grossesse), celles ayant des fausses couches à répétition ou des aneuploïdes à répétition dont l'origine maternelle a été démontrée.

L'étude du premier globule polaire a confirmé que la séparation prématurée des chromatides sœurs est le mécanisme majoritairement impliqué dans les aneuploïdes, et que leur survenue est corrélée à l'âge maternel.

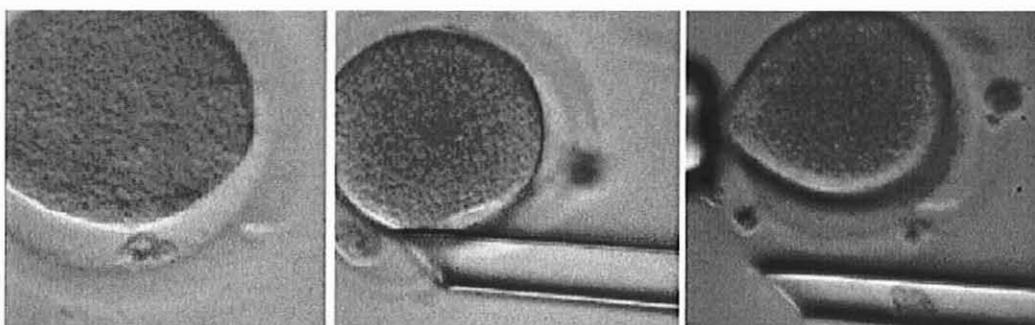


Figure 6 : Biopsie du globule polaire (62)

Cette technique passe par la biopsie du premier globule polaire, sa fixation sur une lame et l'hybridation avec un mélange de 5 sondes.

Grâce à cette technique, on peut identifier le mécanisme à l'origine de l'aneuploïdie, mais en revanche, elle ne permet ni le diagnostic des anomalies de la seconde division méiotique (MII) ni de celle du spermatozoïde, ni celle survenant lors des premières divisions de l'embryon.

Enfin, il semblerait que le PCS, comme le PGS, ait une valeur prédictive sur les chances de grossesse, puisque les taux d'anomalies embryonnaires ou ovocytaires sont stables entre 2 tentatives successives.

Vialard et al en 2008 (62), ont confirmé la stabilité du taux d'aneuploïdie du 1^{er} globule polaire au cours de plusieurs tentatives d'ICSI. En se basant sur la stabilité du taux d'aneuploïdie pour chaque patient, une première étude du 1^{er} globule polaire peut être utilisée comme facteur pronostic pour les tentatives d'ICSI ultérieures. Ceci doit être confirmé par des études dans de plus larges séries.

2.3.3.3. Acteurs moléculaires de la ségrégation chromosomique

L'ensemble de ces résultats a ouvert la voie à de nombreuses études visant à identifier les acteurs moléculaires de la ségrégation chromosomique et de sa régulation, en particulier en cours de la méiose. Parmi ces facteurs, des protéines récemment identifiées et regroupées sous le terme des cohésines, responsables de la cohésion entre les chromatides-sœurs (63). Pendant la transition métaphase-anaphase, ces protéines clivent, entraînant la ségrégation chromosomique. L'action des cohésines s'exerce au niveau des centromères, mais aussi sur de nombreux sites le long des bras chromosomiques.

Les principales protéines de cohésions se nomment SMC1, SMC3, RAD21 et REC8 (64). Récemment, l'étude de souris KO pour le gène SMC1 β a montré le rôle essentiel de cette protéine dans la cohésion des chromatides-sœurs. Ces souris femelles, n'exprimant plus le gène SMC β , présentent toutes un épuisement ovarien prématuré, qui s'effectuent conjointement à une SPCS.

Avec l'âge, une dégradation progressive de ces protéines de cohésion paraît probable. Cette hypothèse pourrait s'expliquer le lien entre la SPCS, l'âge maternel et une susceptibilité génétique. L'existence éventuelle de polymorphismes ou de mutations génétiques des facteurs impliqués dans gamétogenèse chez ces patientes pourrait expliquer cette corrélation.

Tous ces travaux constituent un pas supplémentaire vers une meilleure compréhension des dysfonctionnements méiotiques ovocytaires. Or, ces gènes peuvent également influencer la folliculogenèse et de très nombreux gènes impliqués dans la maturation de l'ovocyte.

2.3.3.4. Mécanismes génétiques de la maturation ovocytaire

Au niveau de la maturation ovocytaire, l'exemple historique d'anomalie génétique est constitué par les femmes atteintes du syndrome de Turner.

Dû à la présence d'un seul chromosome X chez ces femmes, le caryotype est 45, X0 (55 % des cas homogènes 45, X0 ; 45% des cas en mosaïque ou X remanié). Au niveau ovarien, ces femmes présentent une dysgénésie gonadique complète avec la présence de bandelettes fibreuses.

Les dosages hormonaux montrent une FSH et une LH très augmentées, associées à un œstradiol effondré. Il s'agit en fait d'un épuisement ovarien accéléré, puisque les gonades, présentes durant la vie foetale, après épuisement, involuent en bandelettes fibreuses. On parle aujourd'hui de ménopause très précoce.

Depuis, de nombreuses délétions du chromosome X et de translocations X-autosome ont été décrites comme associées à des aménorrhées primaires et/ou secondaires.

De nombreux gènes ont été décrits comme impliqués dans les mécanismes à l'origine d'insuffisance ovarienne prématurée comme les gènes FMR1, BMP15, FOXL2.

Une autre famille de gènes a été décrite, celle des gènes BMP (bone morphogenetic protein) appartenant à la superfamille des TGF β qui est une large famille de facteurs de croissance et de différenciation. BMP15 (appelé également GDF9B (growth differentiation factor-9B) s'exprime avec GDF9 dans la folliculogénèse précoce. Les résultats suggèrent que GDF9 et BMP15 régulent la folliculogénèse de façon spécifique dans les ovaires avec une expression sélective et croissante de BMP15 dans les ovocytes tout au long du développement folliculaire, et BMP15 serait probablement un modulateur sélectif de l'action de la FSH.

Il est admis aujourd'hui, que BMP15 et GDF9 sont 2 gènes essentiels à la croissance des follicules primaires et à la formation des follicules secondaires.

A l'heure actuelle, les étiologies génétiques de ces atteintes sont peu connues, des progrès restent à faire dans la compréhension de l'ensemble des atteintes ovariennes, en sachant que cela concernera probablement de très nombreux gènes.

2.3.3.5. Facteurs génétiques de prédisposition aux atteintes ovariennes ou de la réponse ovarienne.

Récemment, l'étude des polymorphismes génétiques a montré qu'il existait des facteurs de prédisposition pour certaines pathologies comme les ovaires polykystiques. De même, l'existence éventuelle du polymorphisme ou de mutations génétiques concernant des facteurs impliqués dans l'ovogenèse.

Les polymorphismes génétiques sont des variations dans une séquence concernant une région codante n'entraînant pas de disparition de la protéine. Certains de ces polymorphismes sont associés à une variation de l'expression du gène. Cette variation peut être soit positive, soit négative, mais, en aucun cas, il ne peut y avoir une absence d'expression comme dans le cas des mutations ponctuelles.

Au niveau ovarien, de nombreux polymorphismes commencent à être décrits comme étant impliqués dans les mécanismes de l'ovogenèse.

Le plus décrit est celui du récepteur à la FSH (65) qui conduit au remplacement, en position 680 au niveau de la séquence protéique, d'une asparagine par une sérine. Ce polymorphisme serait associé à une augmentation de la FSH basale, à une augmentation de la durée de la phase lutéale et donc de celle du cycle. Des études sont en cours, mais il semble qu'il existerait une réponse ovarienne différente aux hyperstimulations par les gonadotrophines exogènes chez les individus homozygotes pour ce polymorphisme (66). Ainsi, une

augmentation des doses de FSH recombinante permettrait de compenser la moins bonne réponse de ces patientes.

L'étude des polymorphismes ouvre l'ère de la pharmacogénomique en AMP comme le suggère le polymorphisme du récepteur de la FSH (65).

La pharmacogénétique se fonde sur la connaissance du profil génétique du patient pour permettre un ajustement individuel du choix des médicaments et/ou de leur posologie. La pharmacogénomique est un concept plus large, fondé sur une approche du génome humain, consistant à découvrir des marqueurs génétiques sensibles au métabolisme des médicaments. Le but est de mettre au point une stratégie de fabrication de médicaments permettant de les adapter à un groupe ou une ethnie définis. Ces polymorphismes peuvent alors servir de marqueurs correspondants soit à de nouvelles cibles thérapeutiques, soit à de nouveaux outils pour le diagnostic.

En ce qui concerne les gènes ovariens, des augmentations de fréquence de certains polymorphismes ont été montrées chez les patientes ayant des ménopauses précoces, comme pour les gènes GDF9 ou BMP15. Aujourd'hui de nombreuses études sont en cours et les gènes potentiellement impliqués sont nombreux (67). De plus, d'autres gènes, à action ubiquitaire, pourraient également être impliqués, comme ceux des cytokines, des gènes impliqués dans les mécanismes de l'apoptose.

L'utilisation de ces techniques devrait apporter une aide importante au diagnostic mais également une aide au pronostic d'une pathologie donnée et au choix de la thérapeutique à utiliser.

L'étude d'autres polymorphisme génétiques permettra probablement une adaptation plus précise des protocoles de stimulation de l'ovogenèse, mais également d'apprécier la réceptivité utérine des patientes afin d'optimiser les résultats de l'AMP.

2.3.4. Approches fonctionnelles de la compétence au développement

Au-delà de critères « morphologiques », des approches plus fonctionnelles deviennent envisageables. Elles concernent l'ovocyte ou l'embryon, d'une part, l'environnement de l'ovocyte avant la fécondation, d'autre part. Si l'approche transcriptomique sur l'ovocyte ou l'embryon n'est envisageable qu'en situation expérimentale, elle a néanmoins apporté des informations précieuses pour situer la qualité embryonnaire.

2.3.4.1. Approches indirectes de l'environnement ovocytaire

2.3.4.1.1. Analyse du liquide folliculaire : Évaluation de cytokines ou hormones

De subtils changements dans la régulation de la folliculogénèse et la maturation ovocytaire paraissent capables d'induire des aneuploïdies, comme cela a été montré chez les souris. Chez la souris, une exposition à forte dose de FSH durant une maturation *in vitro* peut accélérer la croissance nucléaire et augmenter le pourcentage d'aneuploïdies en méiose II: la FSH semble agir comme un facteur influençant la configuration du fuseau.

Chez l'humain, de nombreux arguments plaident en faveur d'une interaction entre environnement hormonal (FSH en particulier), qualité de la maturation ovocytaire, qualité de la méiose et donc risque d'aneuploïdie.

Une corrélation positive entre la vascularisation périfolliculaire en cours de stimulation ovarienne, l'état chromosomique de l'ovocyte et le taux d'implantation a été montré, l'hypoxie périfolliculaire jouerait également un rôle néfaste sur la configuration du fuseau méiotique et sur la qualité embryonnaire.

Envisageant de trouver des marqueurs dosables dans le sang et le liquide folliculaire (LF) prédictifs du risque d'aneuploïdie, l'étude du liquide folliculaire lors des cycles de diagnostic préconceptionnel (PCS) de F Vialard retrouve une augmentation significative ($p = 0,0144$) du taux de FSH du LF des ovocytes diagnostiqués anormaux par rapport aux ovocytes normaux (68). Cette augmentation serait plus significative pour les ovocytes avec séparation des chromatides-sœurs (SPCS) par rapport aux ovocytes normaux ($p = 0,0334$). Au total, les anomalies chromosomiques et surtout les anomalies avec séparation des chromatides-sœurs apparaissent plus fréquentes lorsque la quantité de FHS dans le LF est plus élevée.

En outre, certains composants du liquide folliculaire ont pu être reliés avec le devenir de l'ovocyte présent dans le follicule.

Ainsi, les concentrations d'hormone antimüllérienne (AMH) dans le liquide issu du follicule dominant ont été corrélées avec les chances d'implantation et de poursuite de la grossesse (69). D'autres travaux ont rapporté récemment une relation entre le niveau d'une cytokine, le Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) dans le liquide folliculaire et le potentiel d'implantation et de développement post-implantatoire de l'embryon qui résultera de l'ovocyte issu de ce follicule (70).

2.3.4.1.2. Approche transcriptomique sur les cellules du cumulus

Cette approche non invasive repose sur le rôle majeur pour la maturation ovocytaire du dialogue ovocyte-cumulus. Ce dialogue ne met pas seulement en jeu la synergie entre les deux compartiments sur le plan métabolique mais aussi l'expression de certains gènes au niveau des cellules du cumulus sous la dépendance ou non de la LH (71). Cette identification ouvre la voie au développement de marqueurs de compétence accessibles en pratique clinique.

2.4. Influence des paramètres de la tentative

2.4.1. le rang de la tentative

De Mouzon a calculé en 1998, d'après les registres de FIVNAT, les taux de grossesse clinique et les taux cumulés de grossesse pour 35714 couples ayant bénéficié de 1 à 6 tentatives de FIV (72).

Le taux de grossesse clinique passe de 20.2% à la première tentative, à 17.4% à la deuxième tentative, à moins de 13% à la sixième tentative.

Par contre, le taux de grossesse cumulé est de 60% avant 35 ans mais chute à 17% à 41 ans. L'âge maternel reste le facteur prépondérant.

2.4.2. Influence de l'indication de l'ICSI

L'analyse critique des données de la littérature a permis une synthèse des données d'efficacité (Tableau 1) par l'équipe d'experts de la HAS en 2007.

Les meilleurs taux de fécondation sont obtenus en cas d'azoospermie obstructive et d'OAT modérée. Concernant les cas d'échecs de FIV pour infertilité féminine, les taux de fécondation au cours des échecs de FIV n'ont pas pu être colligés par l'HAS, mais le taux de grossesse par cycle est inférieur à la moyenne nationale en ICSI, ainsi cette indication semble la plus péjorative pour le pronostic de l'ICSI.

Indications	Paramètres	Moyenne	Nombre* d'études	Niveau de preuve	Comparateur
		(extrême)			
Azoospermie non obstructive	Taux de fécondation/cycle	51,5% (39-67,8)	12	Faible	Aucun
Azoospermie obstructive	Taux de fécondation/cycle	62,8% (52-74,5)	11	Faible	Aucun
Absence bilatérale des canaux déférents	Taux de fécondation/cycle	43%	2	Faible	Aucun
Oligoasthénotéatospermie modérée	Taux de fécondation/cycle	58%	6	Faible	Aucun
Echec de FIV (infertilité masculine)	Taux de fécondation/cycle	59,1% (52-65,6)	8	Faible	FIV
Echec de FIV (infertilité féminine)	Taux de grossesse/cycle	21,2% (15-27,7)	2	Faible	FIV

*Nombre d'études recensées dans l'indication

Tableau n°1 : Evaluation de l'efficacité de l'ICSI par indication. Equipe d'experts de l'HAS en 2007

2.5. Influence des paramètres de la stimulation

2.5.1. Influence du taux d'Œstradiol au jour du déclenchement

De nombreuses études dont celle de Shen en 2003 (12) et Rosen en 2006 (16) retrouvent une corrélation positive entre le taux d'œstradiol plasmatique le jour du déclenchement et les taux de fécondation et de grossesse en ICSI.

2.5.2. les protocoles de stimulation

2.5.2.1. protocoles agonistes versus antagonistes de la GnRH

Les antagonistes sont apparus dans les stimulations pour FIV en 2000. Depuis leur mise sur le marché, la discussion s'est ouverte sur leur efficacité, par comparaison avec les protocoles longs avec agonistes du GnRH.

FIVNAT a effectué une évaluation sur les FIV et ICSI réalisées en France en 2001 en comparant les cycles réalisés avec protocoles longs et ceux avec protocole antagoniste. Il s'agit d'une étude de cohorte qui, par son grand nombre de cas, permet de réaliser des études multivariées.

De nombreux articles comparent leur efficacité sur des séries en général assez courtes et manquant de puissance. Elles concluent, pour la plupart, en l'absence de différence entre les stimulations par antagonistes et les stimulations avec agonistes en protocole long, ce qui n'est pas étonnant compte tenu du faible nombre de cas.

En se référant à la méta-analyse publiée dans Human Reproduction, qui reprend les différentes études de phase 3 concernant soit le Ganerelix[®] soit le Cetorelix[®], soit en doses multiples soit en dose unique, cette étude conclue en une diminution du nombre d'ovocytes recueillis de 1.86 (2.47-1.25). Dans l'étude FIVNAT, la perte apparaît un peu moins nette, de 1.32.

Le taux de grossesse par ponction est abaissé lors de l'usage des antagonistes avec un Odd ratio à 0.79 (0.63-0.99) pour la méta-analyse, similaire à celui de FIVNAT 0.82 (0.75 -0.90). Le nombre de cas très important de l'étude FIVNAT permet de resserrer l'intervalle de confiance mais globalement la conclusion est identique. De même le taux de grossesse par transfert est abaissé avec un Odd ratio à 0.76 (0.60-0.97) pour la méta-analyse et un Odd Ratio à 0.83 (0.76-0.90) pour FIVNAT. La concordance des données ne laisse que peu de place à la contestation.

Par ailleurs, une autre étude de cohorte, celle du DIR (Deutsches IVF Register) arrive à des conclusions très proches des études précédentes. En FIV des taux de grossesse par ponction et par transfert de 21.7 % et 25.8 % en antagonistes (5631 cas) contre 26.1 % et 30.4 % en protocole agoniste long (18175 cas). En ICSI les chiffres sont respectivement de 22.8 % et 24.5 % avec antagonistes (4662 cas) et 28.5 % et 29.9 % en protocole long (16243 cas). L'Odd ratio est de 0.815 (0.77-0.88).

L'étude FIVNAT montre que les protocoles avec antagonistes procurent de moins bons résultats que les protocoles longs avec agonistes et estime la perte de chance à 18 %. Elle est en corrélation avec les résultats publiés par le DIR en Allemagne et avec la méta-analyse de la Cochrane publiée dans Human Reproduction.

Etudes	Nombre de cas	Taux de grossesse		Odd ratio	IC 95%
		antagoniste	agonistes		
FIVNAT FIV	16279	18.56 %	20.97 %	0.819	(0.78 -0.89)
FIVNAT ICSI	15261	21.24 %	24.75 %		
Méta- analyse	1796	25.3 %	30.1 %	0.790	(0.63-0.99)
DIR FIV	18175	21.7 %*	25.8 %*	0.815	(0.77-0.86)
DIR ICSI	16243	26.1 %*	30.4 %*		

* Taux d'implantation.

DIR : Registre allemand de FIV 2001 ; Metanalyse : Cochrane Méta-analyse
Tableau n° 2 : Récapitulatif des études comparant Agonistes et antagonistes de la Gn-RH

Cependant, certaines équipes telles que celle de Felberbaum en 2003, prônent encore actuellement la place des antagonistes de la GnRH, notamment, des plus récents tels que le cétrorelix et ganirelix en FIV et ICSI (73). En raison de leur mode d'action pharmacologique distinct, les protocoles antagonistes permettent une réduction significative du temps de traitement de stimulation. Aucune réaction allergique n'a été signalée jusqu'en 2003 et la compliance des patientes est excellente. La complication la plus grave, l'apparition de cas d'hyperstimulations ovariennes sévères, étant réduite, les auteurs parlent d'une procédure plus sûre que le protocole agoniste long.

Le fait que les antagonistes du GnRH permettent une suppression immédiate des concentrations de gonadotrophines, tout en préservant la réactivité hypophysaire à la GnRH endogène donne une grande flexibilité dans le traitement. Les antagonistes de la GnRH permettent de surmonter certains inconvénients majeurs des agonistes de la GnRH, en particulier du protocole long, qui est actuellement le protocole standard pour la stimulation ovarienne. Les symptômes du blocage hormonal complet sont éliminés, puisqu'aucune période d'inhibition hypophysaire ne se produit. Les deux protocoles antagonistes développés, la dose unique et à doses multiples, sont comparables, en utilisant les données de grandes études prospectives de phase IIIb.

Bien que plusieurs études aient indiqué une légère réduction du taux de grossesse avec des antagonistes de la GnRH par rapport aux agonistes, Felberbaum pense que ce problème peut être rectifié par le développement de schémas antagonistes flexibles conçus au cas par cas.

L'introduction de schémas souples antagonistes de la GnRH pourrait être une évolution de ces protocoles.

Une étude italienne de Greco (74) en 2007 a évalué l'impact du protocole antagoniste lors de la stimulation pour l'ICSI, dans le cadre légal limitant à trois le nombre d'ovocytes micro-injectés. Les 200 patients ont bénéficié de traitements plus courts et d'une dose totale inférieure de gonadotrophines mais les taux d'œstradiol, le nombre total d'ovocytes retrouvés et d'ovocytes matures sont significativement plus bas. Aucune différence n'est retrouvée entre les 2 groupes concernant la quantité et la qualité des zygotes, leur taux de clivage, le nombre d'embryons de bonne qualité replacés et leur devenir clinique. Ils concluent qu'en cas de restriction du nombre d'ovocytes à micro-injecter ce protocole semble le moins invasif, plus sûr et tout aussi efficace que le protocole agoniste long standard.

Plus récemment, Pinto F. et al, en 2009 (75) ont étudié l'impact du protocole agoniste ou antagoniste de la GnRH sur le devenir de l'ICSI au cours d'une analyse multivariée après un ajustement de nombreux paramètres clinico-biologiques. Sur 2 groupes comptant au total 278 cycles d'ICSI, 123 cycles sous agoniste de la GnRH ont été comparés à 155 cycles sous antagoniste de la GnRH en terme de nombre d'ovocytes retrouvés à la ponction et de quantité et qualité d'embryons obtenus.

Dans cette étude, les antagonistes sont associés de façon significative à une durée de traitement moins longue, à des doses totales, une durée de stimulation par FSH recombinante moins longue, une quantité d'ovocytes recueillis supérieure et une qualité embryonnaire supérieure alors qu'avec les agonistes de la GnRH, les taux de fécondation et taux de grossesse sont supérieurs.

2.5.2.2. Intérêt des antagonistes chez les PCO.

Les protocoles antagonistes sont appréciés pour leur meilleure tolérance, leur plus grande sécurité vis-à-vis du syndrome d'hyperstimulation et notamment chez les patientes à risque de type SOPK.

L'étude prospective randomisée de Xavier P. (76) a comparé l'utilisation d'un antagoniste de la GnRH (cétrorelix) et d'un agoniste (buséruvine) pour 131 patientes. La durée moyenne du traitement de stimulation est plus courte sous antagoniste par rapport au protocole agoniste (9.5 vs 10.6 jours). Aucune différence significative n'est notée entre ces 2 protocoles en ce qui concerne la quantité totale de FSH requise, le taux d'œstradiol au jour du déclenchement, le nombre de follicules, l'épaisseur endométriale, le nombre d'ovocytes retrouvés, le taux de fécondation et le nombre de cas d'hyperstimulation. Les taux de grossesse par tentative et par

transfert sont de 15.1% et 17% dans le groupe antagoniste, et de 16.9% et 20.0% dans le groupe agoniste.

La revue de la littérature de 2006 (77) retrouve plutôt une diminution des taux de grossesse, des taux de naissance dans le groupe antagoniste. Cependant, une réduction significative des syndromes d'hyperstimulation sévère est retrouvée avec le protocole antagoniste (OR 0.44, 95% IC 0.21 à 0.93 ; $p=0.01$). De plus, les mesures préventives de l'hyperstimulation (coasting, annulation) étaient plus souvent appliquées avec le protocole agoniste. Les avantages et inconvénients doivent être pondérés au cas par cas et discutés avant un changement de protocole.

2.5.2.3. les gonadotrophines utilisées

2.5.2.3.1. *FSH recombinante versus FSH urinaire*

En 2007, une équipe canadienne a conduit une revue de la littérature (EMBASE, Cochrane, MEDLINE, Science direct) et une méta-analyse d'études randomisées comparant l'efficacité de la FSH recombinante (FSH rec) et celle de la FSH urinaire (FSHur) en protocoles de stimulation ovarienne pour la FIV et l'ICSI (78).

Les principales données étudiées sont les taux de grossesses débutantes par cycle de stimulation, les taux de grossesses cliniques par cycle de stimulation aboutissant à une ponction, par cycle de stimulation aboutissant à un transfert d'embryon, les fausses-couches précoces, les grossesses gémellaires, les syndromes d'hyperstimulation, le nombre de follicules et le taux d'œstradiol au jour du déclenchement, la dose totale de FSH et le nombre total d'ovocytes retrouvés à la ponction.

L'odd ratio (OR) global concernant les taux de grossesse par cycle est de 1.21 ($p=0.05$; IC [1.04,1.42]) en faveur de la FSH rec. L'OR des grossesses débutantes par cycle de stimulation est de 1.29 en faveur de la FSH rec. Aucune différence significative n'a été retrouvée entre la FSH rec et FSH Urinaire en terme de fausses-couches spontanées, de grossesses multiples ou de syndrome d'hyperstimulation ovarienne.

La dose totale de FSH utilisée est inférieure avec la FSH rec. Aucune différence significative n'a été retrouvée concernant le nombre de follicules estimés et le taux d'œstradiol au déclenchement ainsi que le nombre d'ovocytes retrouvés à la ponction. Cependant cette amélioration significative des taux de grossesse sous FSHrec par rapport à la FSHur, n'a pu être démontrée que pour la FIV et non l'ICSI.

2.5.2.3.2. FSH recombinante versus hMG urinaire

Selon Hompes PG et al (79) en 2008, lors du premier cycle de stimulation pour une ICSI, il n'y a pas de différence retrouvée entre l'utilisation de FSH recombinante ou celle d'hMG urinaire purifiée, en termes de taux de fécondation, pour une dose de départ de 150UI/j. Le groupe utilisant l'hMG a un nombre d'ovocytes par ponction inférieur, une tendance diminuée à l'hyperstimulation, un taux d'implantation identique et des taux de grossesses débutantes comparables.

La dernière revue de la littérature (EMBASE, Cochrane, MEDLINE, Science direct) effectuée en 2008 sur le sujet, a identifié 7 études randomisées pour un total de 2159 patientes (80). La méta analyse de ces études a retrouvé une amélioration du taux de naissances avec l'hMG en comparaison avec la FSH rec (RR=1.18 ; 95% IC : 1.02-1.38, p=0.03) ainsi qu'une amélioration du taux de grossesses cliniques (RR=1.17, 95% IC : 1.03-1.34). Aucune différence n'a été remarquée concernant les doses de gonadotrophines, les fausses-couches spontanées, les grossesses multiples, les taux d'annulation de cycle et de syndromes d'hyperstimulation. Pour cette population étudiée, l'utilisation d'hMG a été associée à une augmentation globale de 4% du taux de naissance, en la comparant à l'utilisation de la FSH rec en FIV ICSI en protocole long.

2.5.2.3.3. L'association de LH et FSH recombinantes

La validité de la théorie bicellulaire, la nécessité de l'association de la FSH et de la LH pour la stéroïdogénèse ovarienne pour les patientes déficitaires en gonadotrophines sont démontrées. Cependant, la controverse persiste sur la nécessité d'adjonction d'une supplémentation en LH lors des cycles d'AMP utilisant le protocole agoniste long de la GnRH (81-83). Il est démontré que, pendant la stimulation par FSH et protocole agoniste long, le taux de LH endogène décroît jusqu'à des taux les plus bas en fin de stimulation. Il semblerait donc logique qu'une supplémentation en LH puisse avoir un effet bénéfique en fin de stimulation. Une supplémentation guidée par le ratio décroissant des taux de LH en milieu et fin de stimulation est proposée (83).

Barrufi et al.(82) ont effectué une méta analyse pour évaluer l'efficacité d'une supplémentation par LH recombinante à une stimulation par FSH recombinante lors d'un protocole agoniste long en FIV et ICSI. Ils retrouvent une durée plus courte de stimulation, une dose totale de FSH rec inférieure, un taux d'œstradiol au jour du déclenchement supérieur lors de cette adjonction. Cependant, aucune différence n'est retrouvée en termes de nombre

d'ovocytes retrouvés, de nombre d'ovocytes matures, de taux de grossesse par ovocyte retrouvé à la ponction, de taux d'implantation et de fausse-couches.

D'autres études comme celle de Franco en 2009 (84), concluent à une amélioration de ces critères d'études et défendent l'utilisation de la supplémentation en LH, lors des protocoles FSH rec et agoniste long de la Gn-RH.

De nouvelles études prospectives randomisées plus larges sont nécessaires pour conclure.

2.5.3. Influence du nombre d'ovocytes ponctionnés et nombre d'ovocytes micro-injectés.

Le nombre d'ovocyte ponctionné par tentative chute avec l'âge croissant, surtout au-delà de 38 ans. (9, 15)

Selon plusieurs études (11, 15), le nombre d'ovocytes micro-injectés correspondant au nombre d'ovocytes matures en métaphase II est un facteur prédictif positif du développement embryonnaire. Un recueil ovocyttaire pauvre est pour tous un facteur de risque d'échec.

2.6. Paramètres masculins

2.6.1. Paramètres cliniques

2.6.1.1. Age paternel

Concernant la variation des paramètres spermio-ogiques avec l'âge paternel, la majorité des études ne retrouvent pas de différence significative en termes de numération, en termes de pourcentage de formes normales mais une altération de la mobilité l'âge avançant. Malgré ce constat, la capacité de fécondance du sperme ne semble pas être altérée.

Guérin et al. ont, grâce aux données de FIVNAT sur 30000 cycles de FIV en 1997 retrouvé une diminution des taux de fécondation en FIV classique selon l'âge paternel, malgré l'absence de modification significative des critères spermio-ogiques. En définitive, les taux de grossesse par tranche d'âge de la femme sont identiques (85).

La plupart des études s'accordent à ne pas retrouver de différences significatives en terme de taux de grossesse en ICSI en fonction de l'âge paternel (86).

Cependant Aboulghar, M et al (87) retrouvent une différence significative en termes de taux de fécondation en ICSI en comparant 2 classes d'âge: un premier groupe de 227 individus de 38 ans de moyenne d'âge et un second groupe de 227 individus de 53 ans en moyenne. Le taux de fécondation était significativement plus élevé dans le groupe des hommes jeunes ($P < 0.0001$; OR = 1.36, 95% IC=1.19-1.55).

2.6.1.2. Obésité chez l'homme

Chez l'homme obèse, des troubles de la fonction érectile sont observés, notamment plus de 50% chez les hommes obèses de 40 à 70 ans. Dans cette population des troubles hormonaux sont également constatés associés à des anomalies du spermogramme. Un examen du profil hormonal chez l'homme oligozoospermique révèle une diminution significative du rapport testostérone/œstradiol chez les patients dont l'IMC est supérieur à 25 comparés à ceux dont l'IMC est inférieur à 25 (88). Les auteurs rattachent cette hypoandrogénisme relatif à un trouble hypothalamo-hypophysaire causé par l'excès d'œstrogènes chez les patients obèses.

Une étude américaine portant sur 500 patients a mis en évidence une altération quantitative et qualitative du sperme en fonction de l'IMC : la numération des spermatozoïdes normalement mobiles est négativement corrélée à l'IMC (18.5 millions/mL, 3.6 millions/mL et 0.7 millions/mL respectivement dans les groupes inférieurs à 25, compris entre 25 et 30, et supérieur à 30) et positivement corrélée avec l'index de fragmentation de l'ADN (89).

L'impact de l'obésité sur la fertilité masculine est moins bien documenté que chez la femme. Cependant, les anomalies biochimiques et spermiologiques rapportées sont effectivement associées à une hypofertilité masculine. L'étude de M Sallmen et al (90) portant sur 1329 couples inclus dans l'Agricultural Health Study a en effet révélé que l'odds ratio ajusté de l'infertilité en fonction de l'IMC du partenaire était de 1.12 (IC à 95%= 1.01-1.25).

Chez l'homme, des cas d'azoospermie secondaires ont été rapportés suite à la réalisation de by-pass gastrique, avec perte de 60 à 80 kg, ce qui a été relié à des carences nutritionnelles post chirurgicales.

2.6.1.3. Diabète

Le diabète affecte un nombre croissant d'homme jeunes en âge de procréer. Non seulement se pose le problème des troubles érectiles et éjaculatoires, liés aux complications vasculaires et neuropathiques, mais aussi leurs conséquences sur la qualité du sperme par la diminution de fréquence des éjaculations. Les traitements de ces troubles tels que les inhibiteurs de la phosphodiesterase peuvent altérer la qualité du sperme. Les résultats sont controversés à ce sujet dans la littérature. Le diabète en lui-même altère la spermatogénèse en diminuant la mobilité et la quantité des spermatozoïdes (91).

Certaines études retrouvent une altération globale de tous les paramètres spermatiques : volume de l'éjaculat, numération spermatique, mobilité et formes typiques. Le mauvais équilibre du diabète et l'association à une neuropathie concomitante sont des facteurs péjoratifs. Mais d'autres études ont retrouvés des spermés subnormaux selon les critères

d'analyse conventionnels chez des patients diabétiques hypofertiles (92). De plus, il existe une large variabilité intra-individuelle.

Plusieurs équipes, suspectant une altération moléculaire plus que cellulaire liée au diabète se sont intéressés à l'altération de l'ADN spermatique. Parmi celles-ci, l'équipe d'Agbhave en 2007 (92), retrouve chez ses patients diabétiques hypofertiles, en comparaison à un groupe de patients hypofertiles non diabétiques, une augmentation de la fragmentation de l'ADN nucléaire spermatique et une augmentation des délétions de l'ADN mitochondrial.

De nombreux facteurs sont mis en cause comme le stress oxydatif, les mécanismes de phosphorylation oxydative, le manque de protection des histones. Ils ont émis l'hypothèse que cette altération de l'ADN puisse être en partie provoquée par cette exposition répétée à des glycémies supra-physiologiques, comme une agression oxydative. D'autres études sont nécessaires pour préciser la nature de ces altérations, leurs mécanismes physiopathologiques et leurs implications cliniques précises.

2.6.1.4. Origine du sperme

L'origine du sperme utilisé semble avoir un impact sur la réussite de l'ICSI. Les taux de fécondation en ICSI peuvent être classés, du meilleur au moins bon, selon l'origine des spermatozoïdes : frais éjaculé, éjaculé congelé, épидидymaire puis testiculaire (5).

L'ICSI permet une amélioration du taux de fécondation par rapport à la FIV classique lorsque l'utilisation de sperme testiculaire et épидидymaire est nécessaire (5). La part des ICSI réalisées avec des spermatozoïdes recueillis au niveau épидидymaire ou testiculaire est stable de l'ordre de 6 à 7 % selon l'ABM de 2000 à 2006.

Aoki et al en 2004 retrouvent une amélioration de la qualité embryonnaire et du taux de grossesse en ICSI par l'utilisation préférentielle de spermatozoïdes testiculaires à l'état frais plutôt que congelé (93).

Leur étude rétrospective a comparé l'issue d'une première tentative de FIV ICSI (92 tentatives) effectuée en utilisant la biopsie testiculaire à l'état frais (40 tentatives) ou en utilisant les paillettes congelées (52 tentatives). Un meilleur taux de fécondation est obtenu avec les paillettes de sperme testiculaire 76.5% versus 68.3% pour le sperme frais. Cependant, la qualité embryonnaire définie par un score embryonnaire est meilleure pour le sperme frais 4.54 versus 3.62 pour les paillettes. De même, les taux de grossesse et d'accouchements sont supérieurs pour le groupe sperme frais. Le taux de fausses couches est supérieur pour le groupe utilisant le sperme congelé.

Malgré l'avantage logistique de la ponction ovarienne différée, l'équipe conclut à la plus grande efficacité de l'utilisation de l'échantillon frais de biopsie testiculaire aussi souvent que cela est possible, compte tenu de leur meilleur résultat en termes de qualité embryonnaire, taux de grossesse et taux de fausse-couche.

Néanmoins, il est nécessaire de prendre en compte l'évolution des protocoles de recueil chirurgical testiculaire, de cryoconservation et les habitudes des équipes.

Ainsi plus récemment en 2007, l'équipe de Rigot démontre l'intérêt des recueils d'autoconservation de sperme éjaculé pour les cryptozoospermes (94).

Devant les fluctuations de la numération des recueils de sperme, notamment chez les oligozoospermes sévères et cryptozoospermes ($N < 10^3/\text{mL}$), le risque posé est celui d'une annulation de l'ICSI le jour de la ponction ou de la nécessité d'une biopsie testiculaire selon les centres. Pour éviter cela, il est proposé au patient à risque, d'effectuer des recueils d'autoconservation préalables. Les études, en ce sens, sont encourageantes.

Koscinski (94) a étudié l'issue de tentatives d'ICSI chez des oligozoospermes ayant effectué des autoconservations et cryptozoospermes dont la moitié n'a pu y parvenir. Chez ces derniers, une biopsie testiculaire avait alors été effectuée. Les taux de fécondation et de grossesse par tentative sont comparables entre l'utilisation de sperme frais ou cryoprésumé pour le groupe de patient cryptozoosperme. Par ailleurs, concernant les patients oligospermes ayant chacun réussi leur recueil le jour de la ponction ovocytaire, il n'a pas été retrouvé de différence avec le groupe témoin normosperme.

2.6.1.5. Spermatozoïdes issus de recueils chirurgicaux

Les résultats de l'ICSI avec le sperme testiculaire suggèrent que la fécondation ne nécessite pas une capacitation spermatique.

Les principaux facteurs prédictifs de présence de spermatozoïdes à la biopsie testiculaire en cas d'azoospermie non obstructive sont le volume testiculaire, les taux de testostérone et FSH plasmatiques pré-opératoires (95). Ces paramètres peuvent être des facteurs prédictifs de l'issue de l'ICSI mais nécessitent plus d'études.

Altay et al ont effectué une étude des résultats d'ICSI de patients ayant une azoospermie obstructive ou non obstructive, avec recueil de spermatozoïdes issus de TESE à technique chirurgicale identique (96). Le principal facteur prédictif de réussite est l'âge maternel en termes de taux de fécondation et taux de grossesse pour ces couples.

2.6.1.6. Azoospermies obstructives et non obstructives

Ishikawa et al dans leur étude rétrospective ont étudié les résultats de l'ICSI sur des spermatozoïdes testiculaires cryopréservés chez des azoospermies obstructives et non obstructives (97). Ils ont analysé le nombre d'ovocytes en métaphase II microinjectés, le nombre de zygotes à 2 pronucléi, le nombre d'embryon, le nombre d'embryon remplacé par cycle, les taux de grossesses biochimiques et cliniques, les taux d'implantation et d'accouchement.

Les taux de fécondation chez les azoospermies non obstructives est significativement plus bas qu'en cas d'azoospermie obstructive. Mais de bons taux de grossesse sont retrouvés sans différence retrouvée selon l'origine du sperme.

Les taux de succès de recueil de spermatozoïdes testiculaires lors d'une azoospermie obstructive (AO), améliorés par la microbiopsie testiculaire de type TESE, restent supérieurs à ceux d'une azoospermie non obstructive (ANO). Cependant des études telles que celle de Kanto ne retrouvent pas de différence entre AO et ANO concernant les taux de fécondation en ICSI et taux de grossesse (98).

Zorn B (11), en 2009, a étudié l'influence de facteurs féminins et masculins sur l'issue de 220 premières tentatives d'ICSI utilisant des spermatozoïdes testiculaires en cas d'azoospermie : 107 azoospermies non-obstructives, 72 azoospermies obstructives, 41 mixtes. Son étude de régression linéaire (11) et logistique retrouve une corrélation positive entre le taux de fécondation et le score de Johnsen ($P=0.016$) qui permet une classification de la qualité histologique des tubes séminifères, ainsi que la spermiologie et la mobilité des spermatozoïdes. Le taux de fécondation observé avec une stimulation ovarienne par protocole de type agoniste de la Gn-RH et FSH recombinante est supérieur à celui obtenu avec une stimulation ovarienne avec agoniste et gonadotrophines urinaires. ($P = 0.026$)

L'âge maternel, une fois de plus, est un facteur prédictif des taux de naissance en ICSI avec sperme testiculaire, toutes causes confondues. Le taux de FSH masculin en est un facteur prédictif négatif ($P = 0.019$). L'étude a retrouvé une plus grande proportion de blastocystes développés à partir de sperme congelé par rapport au sperme frais ($P = 0.034$). Le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste influence positivement les taux de grossesse ($P = 0.002$) et de naissance ($P = 0.005$).

En cas d'azoospermie obstructive post-vasectomie le principal facteur prédictif du succès de l'ICSI reste l'âge maternel selon l'étude de Nicopoullos et al(8) .

2.6.2. Paramètres spermiologiques

Concernant le devenir d'ICSI, les paramètres spermiologiques reconnus sont la morphologie du spermatozoïde et sa mobilité. Les résultats de l'ICSI sont indépendants de la numération spermatique : de bons taux de fécondation et de grossesse peuvent être obtenus même en cas d'oligospermies extrêmes.

2.6.2.1. Morphologie

La morphologie du spermatozoïde constitue un paramètre important dans l'exploration de la qualité du sperme d'un homme infertile. Cependant, son évolution est dépendante de la méthodologie utilisée et de l'entraînement de l'observateur. Un éjaculat normal contient des spermatozoïdes présentant des variations importantes de la taille et de la forme de la tête, de l'acrosome, de la pièce intermédiaire et du flagelle.

Une hétérogénéité du sperme existe de manière physiologique, puisque le spermatozoïde est l'aboutissement d'un long processus de différenciation survenant au cours de la spermiogénèse et de la maturation durant le transit épидidymaire. Chacune de ces étapes peut être altérée avec pour conséquence, la production excessive de spermatozoïdes morphologiquement anormaux. La présence de spermatozoïdes morphologiquement anormaux rend compte de la tératozoospermie, dont la définition est empirique en fonction des classifications utilisées. Cependant, la morphologie spermatique semble être le paramètre spermatique le plus constant chez un homme (99, 100).

2.6.2.1.1. Microscopie optique

L'analyse morphologique du sperme ou spermocytogramme peut être réalisée par des techniciens d'imagerie différents. De ce fait, les critères d'interprétation pour définir un spermatozoïde morphologiquement normal sont variables.

L'observation en microscopie optique est la méthode la plus utilisée en routine. Elle s'effectue à partir de préparations fixées et colorées examinées en lumière transmise en grossissement final 1 000 x avec des colorations différentes comme la coloration de Papanicolaou ou encore la coloration de Shorr. Après coloration, les spermatozoïdes sont classés en spermatozoïdes morphologiquement normaux ou anormaux. Trois principales classifications sont actuellement utilisées (100).

La *classification de David* définit le spermatozoïde normal à partir de spermatozoïdes récupérés dans le mucus cervical en post-coïtal. Un spermatozoïde porteur de plusieurs anomalies est identifié par l'ensemble de ses anomalies. Au début des années 1990, cette

classification a subi des modifications consistant en une redéfinition des catégories d'anomalies et la création d'un index d'anomalies multiples (IAM), correspondant au nombre moyen d'anomalies observées, considéré comme un indicateur prédictif significatif du pouvoir fécondant des spermatozoïdes aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. La valeur du pourcentage de spermatozoïdes typiques est définie à 50%.

La **classification de Kruger** a utilisé des critères très stricts pour définir un spermatozoïde normal en évaluant la morphologie des spermatozoïdes trouvés au niveau de l'orifice interne du col après test postcoïtal, comme dans la classification de David (101). Trois groupes de sperme ont été ainsi individualisés en fonction du pourcentage de spermatozoïdes typiques :

- Formes typiques > 14 % : sperme normal ;
- 4 % < formes typiques < 14 % : groupe G-pattern (bon pronostic) ;
- Formes typiques < 4 % : groupe P-pattern (mauvais pronostic.)

La classification de Krugger recense chacune des anomalies observées individuellement alors que celle de David prend en compte toutes les anomalies observées pour un même spermatozoïde. Aucune information n'est donnée sur les vacuoles des têtes spermatiques.

La classification de **l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)** définit, dans son édition de 1992, la description des spermatozoïdes normaux qui a été détaillée et les anomalies du spermatozoïde ont été précisées (tête, pièce intermédiaire, flagelle et reste cytoplasmique). Le TPZ (index de tératozoospermie) est établi et se définit comme la moyenne du nombre d'anomalies par spermatozoïde anormal (100). En 1999, l'OMS a décidé d'adopter les stricts critères du Kruger. La valeur seuil du pourcentage de spermatozoïdes typiques est fixée à 30 %. Les vacuoles doivent occuper moins de 20 % de la surface de la tête spermatique.

Cependant, aucune de ces classifications ne permet de distinguer une tératozoospermie monomorphe d'une tératozoospermie polymorphe. Les tératozoospermies monomorphes intéressent pour une majorité des spermatozoïdes : la tête (microcéphalie, globozoospermie, macrocéphalie, têtes multiples, flagelles multiples) ou le flagelle (dyskinésie flagellaire).

2.6.2.1.2. Microscopie électronique (ME)

L'étude morphologique en microscopie électronique à transmission (TEM) ou à balayage (SEM) des spermatozoïdes présente ainsi toute son importance afin d'évaluer l'intégrité des différentes structures du spermatozoïde.

La TEM visualise des sections de spermatozoïde avec une image en double dimension et des détails des structures très fines à un grossissement x 35 000. La structure tridimensionnelle globale du spermatozoïde est visualisée par la SEM grâce au morphogramme à balayage.

Bartoov et al combinent les résultats des analyses en TEM (acrosome, post-acrosome, flagelle) et SEM (taille et forme de la tête) afin de différencier les hommes fertiles et infertiles (102). Ils définissent un index quantitatif structural appelé QUM (*quantitative ultramorphological index*) qui, combiné aux paramètres conventionnels du sperme, possède une valeur prédictive positive de près de 80 %. Le QUM ne peut, cependant, pas être utilisé en routine.

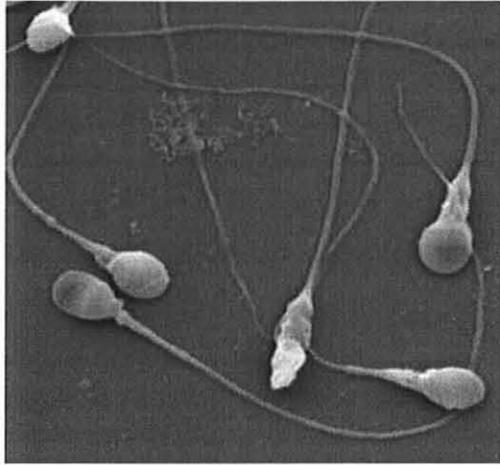


Figure 7 : Spermatozoïdes en microscopie électronique

2.6.2.1.3. L'IMSI : Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection

2.6.2.1.3.1. Définition

Bartoov et al. mettant au point, en 2002, un système optique appelé MSOME pour *high magnification motile sperm morphology examination* qui permet d'examiner le spermatozoïde en temps réel à un grossissement x 6 300 (103). Son installation est basée sur l'utilisation d'un microscope inversé, équipé d'un contraste interférentiel de Nomarski et d'un objectif 100 à immersion. Ce microscope est équipé d'un caméscope vidéo 3D et d'un moniteur couleur.

Les différentes parties du spermatozoïde comme l'acrosome, le post-acrosome, le cou, la pièce intermédiaire, le flagelle et le noyau sont analysées.

Un spermatozoïde normal a une tête ovale, lisse, symétrique, sa taille est comprise entre $4,75 \pm 0,28$ et $3,28 \pm 0,2$ μm . Ces critères ont été définis arbitrairement par rapport aux études antérieures d'observation des spermatozoïdes au Microscope Electronique.

La chromatine est considérée comme anormale si une ou plusieurs vacuoles occupent plus de 4 % de la surface totale de la tête.

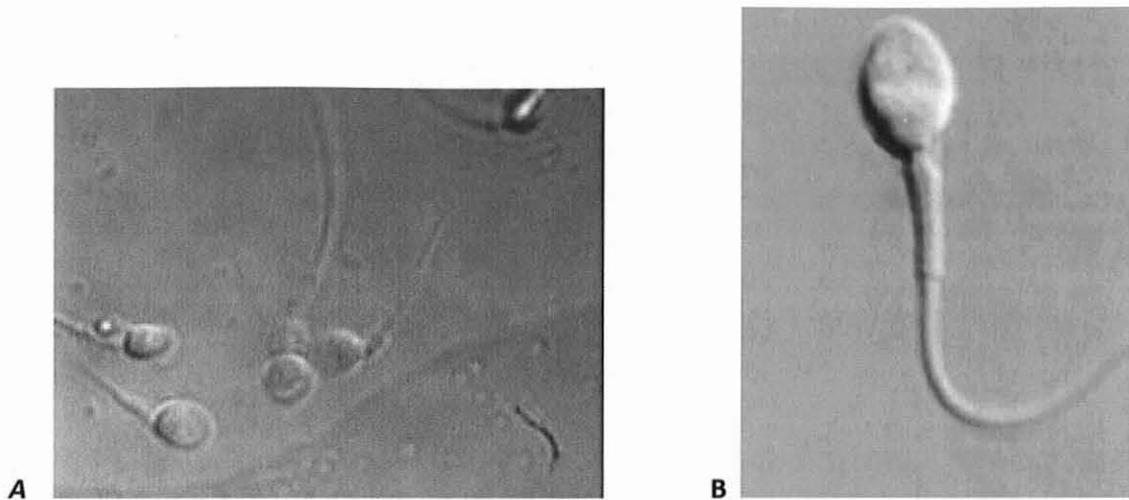


Figure 8 : A et B Spermatozoïdes visualisés en microscopie optique par MSOME : high magnification motile sperm morphology examination (grossissement x6600)

Une tête normale doit avoir une forme normale et un contenu normal (102, 103). Les anomalies détectées par le MSOME sont variables, les critères descriptifs définis par Bartoov et al. ne sont pas, cependant, transposables d'emblée dans un laboratoire pour une analyse de routine (103). Ainsi, il est utile de définir un spermocytogramme MSOME afin d'établir les limites entre les spermatozoïdes normaux et les spermatozoïdes anormaux, le but étant de rechercher un éventuel caractère discriminant de cette étude morphologique permettant de différencier les hommes présentant des spermatozoïdes à pouvoir fécondant a priori conservé de ceux dont le pouvoir fécondant serait altéré.

2.6.2.1.3.2. Spermocytogramme en microscopie optique à fort grossissement

L'équipe d'Ubaldi et Rienzi a tenté d'évaluer l'apport de l'évaluation morphologique en temps réel des spermatozoïdes au grossissement x 6600 et d'établir un spermocytogramme utilisable en activité courante (104).

La surface, la largeur, et la longueur de la tête sont mesurées ainsi que la surface vacuolaire et le pourcentage de cette surface par rapport à celle de la tête. Le nombre de vacuoles est comptabilisé. Au terme de ces mesures, les spermatozoïdes sont classés en fonction des anomalies morphologiques qu'ils présentent et des vacuoles observées.

Les spermatozoïdes ont été alors classés en quatre catégories tenant compte du nombre de vacuoles, de la surface vacuolaire par rapport à la surface de la tête:

- Type 0 : spermatozoïde sans vacuole ;

- Type I : spermatozoïde avec une seule vacuole couvrant 0 à 4% de la surface de la tête ;
- Type II : spermatozoïde avec une seule vacuole couvrant 4 à 16% de la surface de la tête ou au moins 2 vacuoles couvrant 0 à 16% de la surface de la tête ;
- Type III : 1 ou plusieurs vacuoles occupant plus de 16 % de la surface de la tête.

La valeur seuil de 4 % a été définie par Bartoov et al. La valeur de 16 % comme limite entre le type II et le type III, a été choisie arbitrairement à partir d'une estimation visuelle des spermatozoïdes effectuée avant le début de cette étude (103).

Bartoov et al. et Berkovitz et al. supposent que ces vacuoles sont probablement d'origine nucléaire, en se basant sur les données de la microscopie électronique (103, 105). L'aspect du noyau spermatique, observé par le MSOME, reflète la qualité de l'ADN spermatique qui a un impact important sur le développement embryonnaire et le succès de l'ICSI (103, 105).

2.6.2.1.3.3. MSOME appliquée à l'ICSI, la naissance de l'IMSI

62 % des couples en échec d'ICSI conçoivent après une tentative d'IMSI (*Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*) sans augmentation du taux de fécondation. Bartoov et al. (105) supposent l'existence d'une possible relation entre les anomalies spermatiques chromosomiques, responsables du défaut d'implantation embryonnaire ou de fausses couches précoces, et le statut nucléaire spermatique évalué par le MSOME (105).

Hazout a entrepris son étude afin d'évaluer l'utilité de ce système optique à fort grossissement pour sélectionner les spermatozoïdes à utiliser en ICSI chez les couples avec répétition d'échecs en ICSI (106). Les couples avec deux ou plus de deux précédents échecs en ICSI ont subi une tentative d'ICSI classique, suivie par une tentative d'ICSI à fort grossissement, l'ADN des spermatozoïdes a été évalué.

Dans l'ensemble du groupe « échecs multiples d'ICSI », l'IMSI améliore les résultats cliniques : taux de grossesse, d'implantation, d'accouchement et le taux de natalité, sans affecter les résultats biologiques : taux de fécondation et de clivage, morphologie de l'embryon. L'amélioration des résultats cliniques d'ICSI est évidente, aussi bien chez les patients avec un haut degré de fragmentation de l'ADN que ceux dont l'ADN spermatique est normal.

Berkovitz et al. ont trouvé une corrélation négative entre la taille des vacuoles et la stabilité de la chromatine qui semble influencer le développement embryonnaire (105). Junca et al. ont montré que l'ICSI, avec sélection des spermatozoïdes en haute résolution, améliore les taux de grossesse et d'implantation, en cas d'échec d'implantation, de tératospermie sévère et de fragmentation importante de l'ADN spermatique (107).

Dans une étude récente, Bartoov et al. ont mis en évidence que la surface occupée par les vacuoles augmentait d'autant plus que l'incubation des spermatozoïdes à 37° C était longue (pendant plus de 2 heures).

2.6.2.1.3.4. Potentiel de fécondance défini par un score de classification morphologique du spermatozoïde en temps réel en ICSI

Une nouvelle classification morphologique des anomalies de la tête des spermatozoïdes est proposée par Cassuto N G et al (13) en 2008 pour améliorer la sélection du spermatozoïde en ICSI et augmenter le taux de fécondation, en particulier pour les couples dont les femmes ont 30 ans et plus.

Leur étude rétrospective vise à mieux comprendre la corrélation entre la normalité morphologique des spermatozoïdes, la fécondation et développement embryonnaire précoce, et à établir une classification détaillée des spermatozoïdes pour prévoir, en temps réel lors de l'injection intracytoplasmique du spermatozoïde, le meilleur potentiel fécondant. Avant l'ICSI, les spermatozoïdes mobiles ont été marqués après aspiration. Le taux de fécondation des ovocytes, le développement embryonnaire et de la morphologie, les résultats de l'injection de spermatozoïdes mobiles marqué ont été pris en compte. Ils prennent en compte la normalité de la taille et la forme de la tête, la base de la tête, et l'absence de vacuoles.

Le score est basé sur la somme de 3 critères : (tête normale = 2 points) + (absence de vacuole = 3 points) + (base normale = 1 points) = score total sur 6 points.

La notation de trois classes de spermatozoïdes injectés au score décroissant a révélé une différence statistiquement significative sur le taux de fécondance: 39 sur 46 (84%), 94 sur 128 (73%), et 27 sur 44 (61%), respectivement. La contribution de l'âge maternel en corrélation avec l'évaluation du sperme a révélé une distinction entre les ovocytes provenant de femmes de moins de 30 ans et ceux de femmes âgées de 30 ans et plus.

Le classement proposé permet de choisir pour l'ICSI le meilleur spermatozoïde, en particulier pour les ovocytes de femmes âgées de 30 ans et plus.

2.6.2.2. La mobilité spermatique : le reflet de la vitalité des spermatozoïdes

Contrairement aux paramètres précédents, la mobilité du spermatozoïde est corrélée au résultat de l'ICSI car elle est le reflet de la vitalité du spermatozoïde. Les cas d'asthénospermies complètes ou akinétopermies, avec une immobilité complète des spermatozoïdes, sont rares. Les recueils de sperme éjaculé répétés ou la biopsie testiculaire peuvent pallier ce problème en retrouvant quelques spermatozoïdes mobiles.

L'étude de la vitalité des spermatozoïdes constitue l'élément clé dans le choix des spermatozoïdes susceptibles d'être utilisés en vue de l'ICSI.

Au cours de la sélection du spermatozoïde, s'il n'est pas mobile, il est possible avec une certaine habitude de sélectionner le spermatozoïde à micro-injecter en vérifiant avec la micropipette que le flagelle est souple et non rigide.

La dyskinésie ciliaire primaire, anciennement connue sous le nom de syndrome des cils immobiles, cause une atteinte respiratoire et reproductrice. En incubant les spermatozoïdes avec la pentoxifylline l'équipe de Yildirim a obtenu de meilleurs résultats en termes de mobilité des spermatozoïdes pour la sélection en ICSI (108).

2.6.2.3. L'étude de la membrane spermatique par le HOST : Hypoosmotic swelling test

Plus objectif, le test de gonflement flagellaire du spermatozoïde en milieu hypo-osmolaire (HOST), est utilisé pour tester l'intégrité structurale et fonctionnelle de la membrane des spermatozoïdes et distinguer les spermatozoïdes immobiles mais vivants.

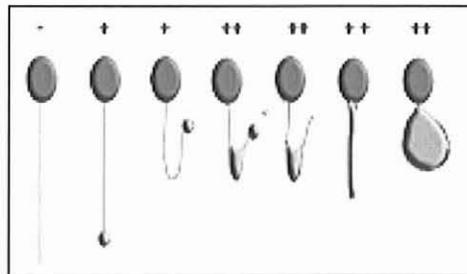


Figure 9 : Hypo-osmotic swelling test, ou test de gonflement flagellaire en milieu hypoosmotique. Le 1^{er} spermatozoïde à gauche est altéré, les suivants répondent à la réaction : courbure en épingle à cheveux, raccourcissement et épaississement du flagelle avec gonflement de la membrane

La membrane plasmique du spermatozoïde en milieu osmolaire laisse pénétrer l'eau dans la cellule qui gonfle et se ballonne.

Le HOST peut être utilisé pour améliorer la sélection du spermatozoïde, notamment chez les akinétospermes. Il s'agit d'une analyse individuelle : le spermatozoïde sélectionné est sorti du PVP et plongé dans la solution hypo-osmolaire en un temps de séjour minimal, ce qui induit une réaction de gonflement de l'extrémité de son flagelle lorsque celui-ci est vivant. En cas de mort cellulaire, rien ne se produit. Il est admis que cette méthode peut être utilisée pour étudier l'intégrité membranaire du flagelle mais ne peut prouver l'intégrité fonctionnelle céphalique.

2.6.3. La génétique du spermatozoïde

2.6.3.1. Anomalies chromosomiques

Des explorations cytogénétiques sont effectuées au préalable, chez les couples inclus en FIV ICSI. Leur but est diagnostique à la recherche d'une cause chromosomique à l'infertilité du couple. Ces anomalies chromosomiques peuvent être numériques, comme le syndrome de Klinefelter (47, XXY), le syndrome de Turner (45, X0) et leurs variantes, les réversions sexuelles, comme les hommes XX ou les femmes XY. Mais elles peuvent être aussi structurales comme les translocations robertsoniennes ou réciproques, les inversions ou les délétions. Retrouver une origine chromosomique peut aussi avoir une valeur pronostique en guidant les grossesses obtenues par FIV et ICSI et éventuellement en proposant un diagnostic préimplantatoire ou prénatal (109).

2.6.3.2. Succès des extractions chirurgicales des spermatozoïdes et ICSI chez les patients atteints du Syndrome de Klinefelter.

Les hommes porteurs du syndrome de Klinefelter ont un hypogonadisme hypogonadotrope. Ce syndrome est diagnostiqué chez 11% des azoospermes et 1 pour 500 nouveaux-nés. Une non-disjonction méiotique est à l'origine du caryotype 47, XXY le plus souvent et en mosaïque pour 3% des hommes 46, XY / 47, XXY. Les patients porteurs de l'anomalie en mosaïque ont une spermatogénèse conservée et des spermatozoïdes présents dans l'éjaculat le plus souvent. Mais les patients 47, XXY sont considérés comme inféconds. Ils conservent quelques îlots testiculaires de spermatogénèse au sein de plages extensives de cellules de Leydig et de tubules sclérotiques.

2.6.3.2.1. Le syndrome de Klinefelter est l'anomalie caryotypique la plus représentée en ICSI.

Depuis le 1^{er} succès de naissance par TESE-ICSI pour un patient Klinefelter en 1997, de plus en plus de centres partagent leur expérience en ce domaine sur de petits contingents, même s'il n'existe pas de méta-analyse sur le sujet. Les études de ces équipes s'accordent sur le fait que les taux de succès des microbiopsies testiculaires (TESE) sont comparables entre les patients au caryotype 47, XXY non mosaïque et ceux porteurs d'une azoospermie non obstructive à caryotype normal (110, 111), de même pour les taux de fécondation et de grossesse par biopsie testiculaire (111).

2.6.3.2.2. Prétraitement par anti aromatasase, hCG, et FSH.

Dans son étude sur huit ans, Shiff traite par inhibiteurs de l'aromatase les patients au taux de testostérone inférieur à 15.6nmol/L avant la TESE pour l'ICSI (110). Ces taux sont mesurés au moins 6 mois après l'arrêt de tout traitement hormonal. Les taux moyens de FSH et de testostérone avant traitement sont de 33.2UI/L et 9.8nmol/L. En cas de résistance aux anti-aromatases, certains patients ont reçu de l'hCG d'autres de la FSH Rec. Suite au traitement médical le taux moyen de testostérone s'élève à 17nmol/L ($p<0.01$). Les taux de micro-biopsies positives par tentative est de 72% (39/54) et de 29 / 42 hommes, permettant l'ICSI sue sperme frais.

Les auteurs ont attribué les taux de succès des micro-biopsies à leurs pré-traitements. 33 ICSI ont conduit à un transfert d'embryons, sur les 39 cycles. 18 grossesses cliniques ont conduit à 21 naissances. Tous les enfants sont nés avec un caryotype normal.

Friedler et al. ont retrouvé des résultats d'ICSI comparables entre sperme frais et congelé pour les Klinefelter (112).

2.6.3.3. Altération de l'ADN spermatique

L'évaluation actuelle des paramètres spermatiques de routine est considérée comme un facteur pronostique insuffisant du devenir de l'ICSI, notamment car elle ne permet pas l'évaluation de l'altération de l'ADN.

Le spermatozoïde présente la particularité d'avoir un génome totalement inactif, jusqu'au moment où il se trouve incorporé dans l'œuf fécondé. Il s'en suit une réorganisation post-méiotique du génome (figure 10).

Différentes approches diagnostiques ont été envisagées allant de la mise en place en routine de tests de l'ADN des spermatozoïdes pour évaluer sa condensation (niveau d'acétylation des histones et leur remplacement par des protamines), sa fragmentation, sa méthylation, à une approche de recherche fondamentale de type génomique, protéomique.

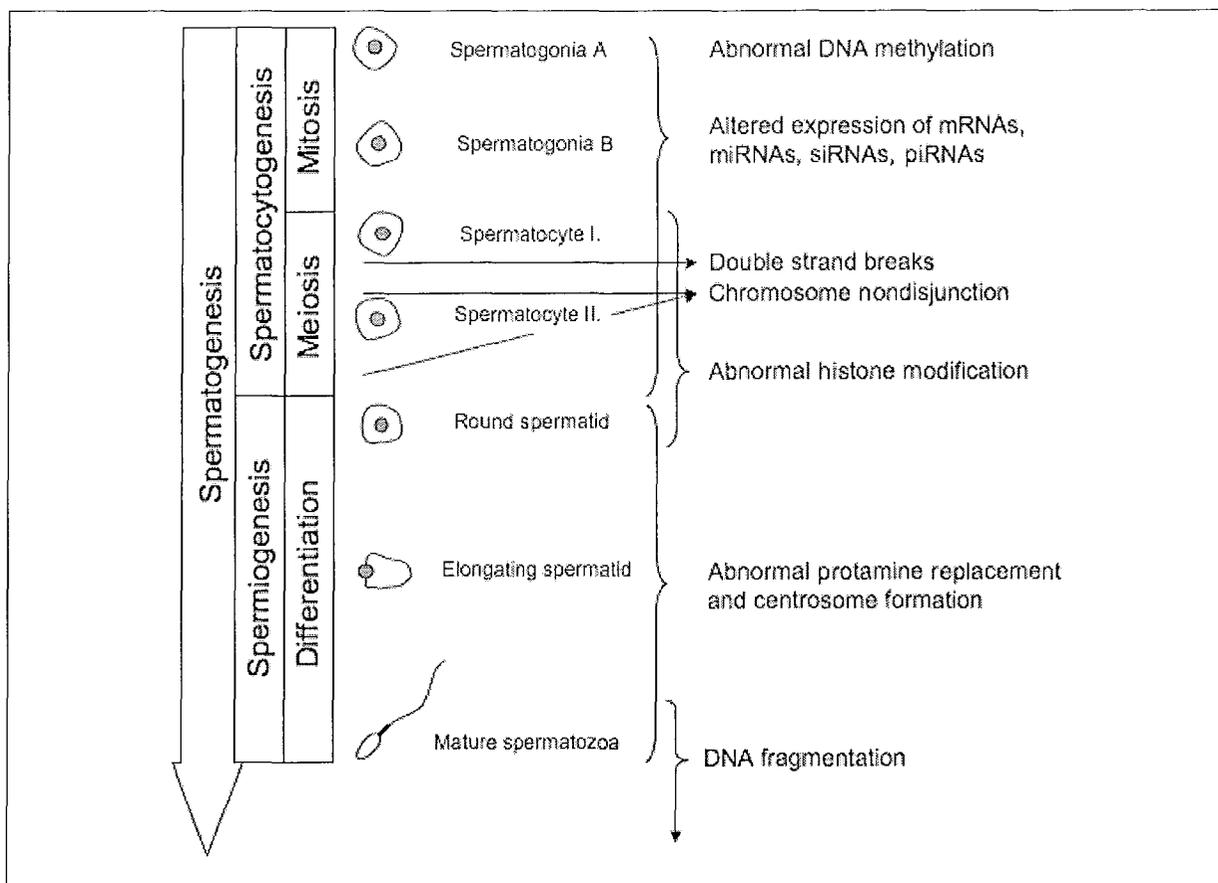


Figure 10: Nanassy and Carrell ; *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction* 2008

2.6.3.3.1. La Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est impliquée dans des processus divers tels que : l'empreinte parentale, l'expression du génome, l'inactivation du chromosome X, l'expression différentielle de gènes.

Durant la spermatogénèse il y a une augmentation de la méthylation et une reméthylation active de certains gènes durant le transit épидидymaire.

Chez l'Homme, il y a une déméthylation active du génome paternel lors de la fécondation par des facteurs ovocytaires ainsi qu'une conformation permissive de la chromatine paternelle. Le zygote formé est méthylé, puis l'embryon est déméthylé progressivement jusqu'au stade morula. Au stade blastocyste, la masse cellulaire interne seule se reméthyle tandis que le trophoctoderme reste déméthylé.

Ces étapes doivent permettre la différenciation cellulaire et l'expression spécifique de gènes indispensables à l'implantation et à la nutrition de l'embryon.

L'immunomarquage de la 5Méthyle cytosine sur les spermatozoïdes humains révélé par la diaminobenzidine (DAB) a permis d'évaluer le niveau de méthylation de l'ADN et de le confronter aux taux de grossesse.

Les défauts de méthylation de l'ADN spermatique influenceraient les capacités de fécondation des spermatozoïdes : effet paternel précoce, et/ou le développement des embryons : effet paternel tardif.

2.6.3.3.2. La fragmentation de l'ADN

Il s'agit d'une cassure de l'ADN double brins due à une agression extérieure.

2.6.3.3.2.1. Origine de la fragmentation de l'ADN

Celle-ci peut avoir pour origine l'apoptose, l'oxydation par les radicaux libres ou une anomalie de la spermatogénèse.

Des pathologies telles que l'infection ou l'inflammation du tractus génital, la varicocèle, la cryptorchidie, la radiothérapie ou la chimiothérapie peuvent être associées à une augmentation de cette fragmentation de l'ADN.

L'exposition à des toxiques industriels, à des sources de stress oxydatif, au tabac et drogues telles que le cannabis sont mis en cause, mais parfois, l'étiologie reste idiopathique (figure 11).

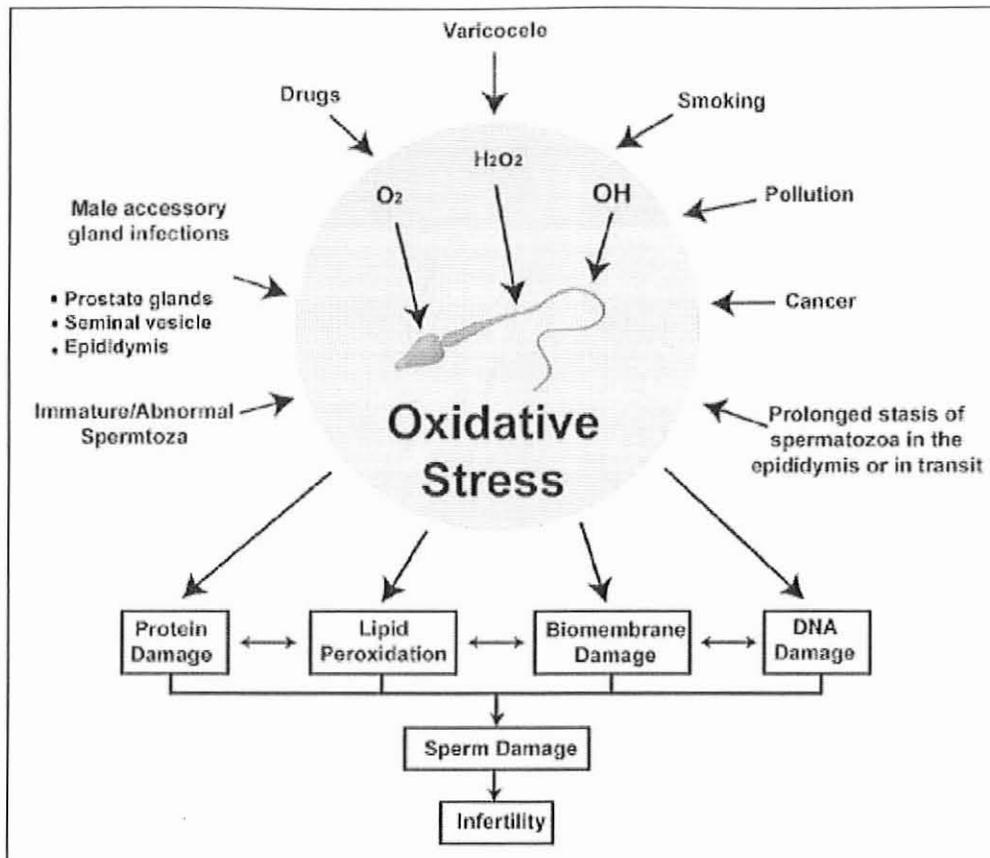


Figure 11 : Impact des dérivés oxydatifs (Reactive oxygen species) sur l'infertilité

2.6.3.3.2.2. Les méthodes pour la quantification de la fragmentation :

Différentes méthodes de quantification de la fragmentation de l'ADN ont été développées avec une efficacité comparable (113).

- La technique dite **TUNEL** (Terminal Uridine Nucleotide End Labeling), quantifie par cytométrie de flux au microscope à fluorescence, l'incorporation du dUTP (déoxyuridine triphosphate), au niveau des ruptures de l'ADN double et simple brin.
- Le **SCSA** (Sperm Chromatin Structure Assay) est basé sur la réponse différentielle à la coloration de l'acridine orange des spermatozoïdes à ADN fragmenté (coloration en rouge), et ADN non fragmenté (coloration en vert).

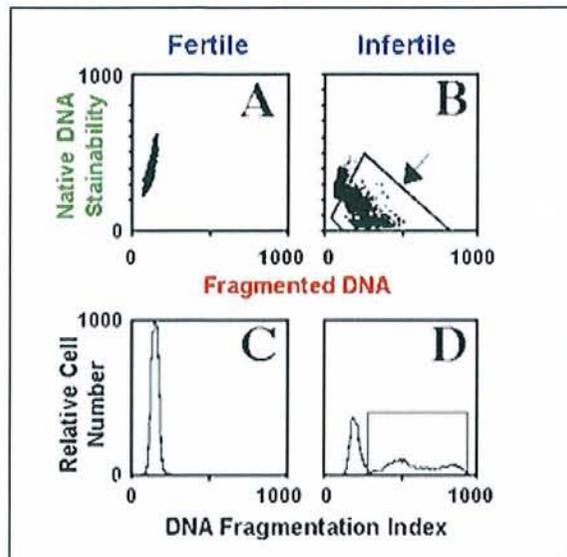


Figure 12 : Analyse de centaines de spermés par SCSA. Comparaison d'échantillons de patients féconds(A) et de patients/couples ayant expérimenté une répétition de fausses couches (B). Les échantillons de couples fertiles sont peu ou pas fragmentés, contrairement à ceux des couples inféconds.

Le calcul du **DFI** (DNA Fragmented Index = Taux de fragmentation de l'ADN) se fait par le rapport de la proportion de fluorescence rouge sur le total de la somme des fluorescences rouge et verte.

- La technique **COMET assay** est basée sur un traitement déprotéinisant le noyau des spermatozoïdes puis une incorporation dans l'agarose et une électrophorèse afin de déplacer les fragments d'ADN, entraînant la formation d'une comète. Celle-ci est quantifiée par un analyseur d'images.

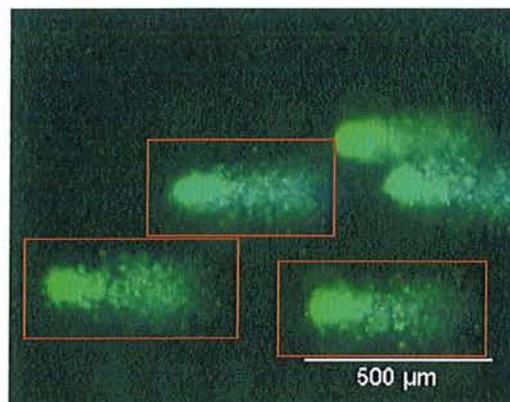


Figure 13: C Helma et M Uhl, Introduction de "A Public Domain Image Analysis Program for the Single Cell Gel Electrophoresis Comet Assay," Mutation Research (2000)

2.6.3.3.2.3. *Le taux de fragmentation de l'ADN : DFI*

Une corrélation négative est retrouvée entre les caractéristiques spermatiques et la proportion de spermatozoïdes montrant un ADN fragmenté.

La littérature (114-116) reconnaît globalement que pour un taux de fragmentation supérieur à 15%, est observée une chute du taux de fécondation en FIV classique et en ICSI. Pour un DFI supérieur à 15%, sont également reconnus une diminution de l'évolutivité embryonnaire, une diminution de la probabilité de grossesse en ICSI et une augmentation du nombre de fausses couches en FIV classique et ICSI.

2.6.3.3.2.4. *DFI et ICSI*

Plusieurs études (Filatov en 1999, Morris en 2002, Tomsu en 2002) ont analysé la structure et l'intégrité de l'ADN du sperme et ont reporté un impact délétère sur les taux de grossesse en FIV, lorsqu'un pourcentage élevé de spermatozoïdes est porteur d'ADN fragmenté. Ces études avaient suggéré que l'altération de l'ADN pourrait servir de marqueur pour l'évaluation de l'effet paternel sur le développement zygotique préimplantatoire.

Benchaïb et al en 2003 montrent dans leur étude qu'un taux élevé d'ADN spermatique fragmenté est un facteur péjoratif pour l'obtention d'un embryon lors de l'ICSI mais pas en cas de protocole de FIV classique (114).

Le taux de fragmentation de l'ADN semble être utile comme facteur prédictif de l'issue de l'ICSI même si la qualité embryonnaire, basée sur son étude morphologique, ne semble pas affectée par la fragmentation de l'ADN.

Selon Tésarik en 2004, l'effet paternel de la fragmentation de l'ADN sur le développement embryonnaire est plutôt tardif (115). Il est reconnu que les échecs de fécondation répétés en FIV peuvent être dus à un effet paternel. Tésarik a essayé de démontrer le lien possible entre échecs de fécondation répétés en ICSI et la fragmentation de l'ADN. Il en conclut que l'évaluation de l'intégrité de l'ADN peut être utile pour détecter un effet paternel tardif qui n'est pas associé à des anomalies morphologiques du zygote et des premiers stades de clivage. Avendano et al en 2009 dans leur étude retrouvent que la fragmentation de l'ADN chez les patients ayant un sperme « normal » selon les critères morphologiques a un impact négatif sur la qualité embryonnaire et la probabilité de grossesse en ICSI pour un seuil de 17.6% de fragmentation (116).

Cependant si l'étude de Chohan en 2006 met clairement en évidence des taux de fragmentation de l'ADN plus élevés chez les patients inféconds par rapport au groupe

contrôle de témoins donneurs de sperme ; dans la population des oligoasthénospermes, les taux sont comparables entre patients inféconds et témoins féconds (113).

De plus, la variabilité inter et intra-individuelle du taux de fragmentation est très importante dans cette population d'hommes oligoasthénospermes.

Ceci pose à nouveau la question de l'intérêt de son application en pratique courante.

En cas de taux de fragmentation élevé, il convient de traiter la cause si elle existe (infection, varicocèle). Lorsqu'aucune cause n'est mise en évidence un traitement à base d'antioxydant peut être proposé : Vitamine C, E, Zinc, Sélénium.

2.6.4. Impact de la leucospermie(117)

La leucospermie est très fréquente mais n'atteint de niveau important que chez 15 à 20 % des patients infertiles. Les leucocytes produisent des radicaux libres extrêmement instables et donc toxiques. Ils induisent également la sécrétion de radicaux libres par les spermatozoïdes.

Le plasma séminal contient de puissants facteurs antioxydants. De fait, la leucospermie n'est qu'inconstamment associée à une dégradation des paramètres ou des fonctions spermatiques.

In vitro le processus est totalement modifié : les leucocytes par le biais des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) qu'ils produisent sont de puissants facteurs de dégradation des fonctions spermatiques, alors qu'il n'existe plus de facteurs antioxydants. Sont atteintes : la capacité à faire leur réaction acrosomique, leur mobilité, leur capacité fusiogène. Enfin la fragmentation de l'ADN est considérablement augmentée.(117)

2.6.4.1. Effets de la leucospermie sur les résultats en FIV

Des études ont montré de façon indépendante une corrélation négative entre la présence de leucocytes dans le sperme et le taux de fécondation lors de la FIV.

Ainsi, des études telles que celle de Talbert et al. ont mis en évidence que les paramètres séminaux les plus corrélés avec une baisse de la capacité fusiogène des spermatozoïdes sont le faible taux de mobilité progressive et la présence d'un grand nombre de leucocytes (118). Le degré de contamination par les leucocytes du sperme est un critère prédictif de la fécondance in vitro.

Dans une étude de Zorn B et al, sur 147 spermes provenant de couples infertiles, la production de DAO a été négativement corrélée aux paramètres spermatiques standards et positivement corrélée avec les anomalies de la tête. Après FIV, le taux de fécondation et de grossesse étaient négativement associés avec le taux de DAO ($p = 0,031$ et $0,041$). Chez les sujets

présentant un taux de DAO élevé, le pourcentage d'embryons atteignant le stade blastocyste était significativement diminué après ICSI (119).

2.6.4.2. Prise en charge de la leucospermie

2.6.4.2.1. Les études

Il n'est pas démontré que le traitement du syndrome inflammatoire restaurait effectivement les capacités fécondantes du sperme. Des essais thérapeutiques tendant à s'affranchir du syndrome inflammatoire ont été menés. Ainsi des monothérapies par glutathion, antibiotiques ou vitamine E ont été réalisées ainsi que des traitements antibiotiques.

Bien que des améliorations aient été rapportées, ils ont donné des résultats discordants. Mais ils ont souvent été effectués sur de petits effectifs, avec des thérapeutiques symptomatiques données sans prendre en compte les causes du syndrome inflammatoire, ou parce que les patients ont été suivis sur de trop brèves périodes (moins de trois mois) alors que des données préliminaires laissent à penser que si une amélioration doit avoir lieu, elle peut être très longue à apparaître.

Les normes de la leucospermie retenues pour l'inclusion des patients ainsi que son évaluation sont très variables.

Toutefois certaines études ont permis de montrer que le traitement antibiotique améliore de taux cumulatif de grossesse sur six mois chez des patients leucocytospermiques présentant une infertilité par ailleurs inexplicée, ce qui n'est pas le cas si un tel traitement est donné de façon indifférenciée à tous les patients infertiles avec une leucocytospermie (120).

2.6.4.2.2. Hypothèses

Le temps est un élément à prendre en compte car les défenses séminales sont susceptibles de s'épuiser avec le temps et l'infertilité peut alors s'installer. On ne découvre jamais une infection génitale aiguë lors du bilan d'une infertilité mais toujours des infections anciennes remontant à dix ans environ.

La sensibilité individuelle au stress oxydatif peut également expliquer que des hommes soient fertiles pour des niveaux de leucospermie pour lesquelles d'autres seraient stériles du fait des lésions entraînées par les radicaux libres.

Enfin les fragmentations de l'ADN en relation avec la production des DAO peuvent avoir des conséquences à plus long terme sur le développement de la grossesse et pas forcément sur le seul taux de fécondation ou sur le taux d'implantation. Elles sont susceptibles d'entraîner des blocages de division voire des grossesses arrêtées ou des fausses couches.(117)

2.6.4.2.3. En pratique

Bien qu'ils interviennent dans la physiologie de l'appareil génital et des spermatozoïdes, les DAO, quand ils sont produits en trop grande quantité, ne sont jamais bénéfiques *in vivo*. *In vitro*, ils sont toujours délétères, ce qui justifie que tout patient présentant une leucospermie soit traité avant une prise en charge en AMP et ce d'autant plus lorsqu'il n'existe pas d'autre étiologie à l'infertilité du couple.

Selon l'étude de J-P Wolf et al, le patient doit recevoir au minimum des antioxydants, voire des anti-inflammatoires, car pour améliorer la qualité embryonnaire il est nécessaire d'assurer la qualité optimale des spermatozoïdes (117).

Devant une leucospermie majeure entre un à cinq millions de leucocytes/ml, selon les équipes, un traitement similaire à celui d'une prostatite chronique au moins trois mois avant l'AMP incluant antibiothérapies et anti-inflammatoires, peut se légitimer mais aucune étude prospective randomisée n'a encore eu lieu.

2.6.5. Impact des antioxydants

L'effet bénéfique de ces traitements antioxydants est encore discuté à ce jour et les observations sont parfois contradictoires.

L'utilisation de traitements antioxydants a pour but de lutter contre les dérivés actifs de l'oxygène qui conduisent à la formation de produits oxydatifs, potentielles sources d'altération de l'ADN et d'effet mutagène.

Greco, en 2005, a étudié le bénéfice sur les issues d'ICSI, de traitements oraux antioxydants lors d'altération de l'ADN spermatique (121). Un traitement à base de vitamine C 1g/j et vitamine E 1g/j a été suivi par 38 hommes dont le taux de fragmentation (DFI) était élevé (> or =15%) sur l'éjaculat, pendant 2 mois après un échec de tentative d'ICSI.

Pour 29 de ces cas, ce traitement a conduit à une décroissance du DFI et à une amélioration du taux de réussite de la tentative suivante. Cette étude ne retrouve pas d'amélioration du taux de fécondation ni du taux de clivage ni de la morphologie embryonnaire entre les deux tentatives d'ICSI sans puis avec le traitement antioxydant. Cependant, une amélioration des taux de grossesse (48.2% versus 6.9%) et d'implantation est retrouvée (19.6% versus 2.2%). Cette étude sur de petits contingents est en faveur d'une amélioration des résultats de l'ICSI, en cas de fragmentation de l'ADN, par un prétraitement par antioxydants.

L'étude de Menezo en 2007 (122) retrouve également une régression de la fragmentation de l'ADN (-19.1%, $P < 0.0004$), suite à un traitement par vitamines anti-oxydantes associées à

du zinc et du sélénium sur une durée de 90 jours mais également une augmentation de la décondensation de l'ADN d'une même ampleur (+22.8%, $P < 0.0009$). L'ouverture des ponts disulfures interchaînes des protamines peut expliquer cet effet. En effet, les antioxydants tels que la vitamine C, sont capables de s'insérer dans les réseaux de cystine et par conséquent d'interférer dans le génome paternel en phase de développement préimplantatoire.

Des observations telles que celles-ci expliquent le désaccord des équipes sur le rôle des antioxydants pour l'amélioration de la fertilité masculine.

2.7. Facteurs techniques influençant le succès en ICSI

Indépendamment des indications de l'ICSI et de l'histoire clinique des patients, des paramètres techniques et les conditions techniques de laboratoire peuvent affecter le devenir de l'ICSI (diminution du nombre d'ovocytes recueillis à la ponction, taux élevés de dégénérescence, faible taux de fécondation, blocage du développement zygotique). Peuvent être mis en cause la qualité du matériel de l'ICSI, les traitements enzymatiques, l'expérience du technicien.

2.7.1. Immobilisation du spermatozoïde

Les premières équipes réalisant l'ICSI constatèrent que le ralentissement dans le PVP ou l'immobilisation du spermatozoïde par pression « douce » aboutissaient à des taux de fécondation modérés (30-40%).

Par contre une immobilisation « agressive » par cisaillement du flagelle élevait le taux de fécondation à 50-70%. Ce geste est bénéfique aussi sur les spermatozoïdes épидидymaires pourtant moins mobiles. En fait, cette immobilisation « agressive » entraîne une perte de l'intégrité membranaire du spermatozoïde qui pourrait faciliter la libération de facteurs spermatiques cytosoliques dans le cytoplasme ovocytaire et le passage de facteurs ovocytaires de décondensation de la chromatine vers le noyau du spermatozoïde.

2.7.2. Rupture de la membrane plasmique ovocytaire

Trois types de rupture de la membrane plasmique ont été décrits :

- la rupture normale pour laquelle la membrane se rompt uniquement lorsque la micropipette a atteint le centre de l'ovocyte ;
- la rupture brusque pour laquelle la membrane se rompt dès que la micropipette entre en contact avec la membrane,

- la rupture difficile pour laquelle la membrane se rompt uniquement après plusieurs avancées de la micropipette.

Selon le type de rupture, le taux d'ovocytes en dégénérescence, le taux de fécondation et la qualité embryonnaire différent. Les ovocytes humains peuvent supporter un minimum de contraintes mécaniques et physiologiques durant l'ICSI mais une rupture anormale ou difficile de la membrane plasmique peut accroître le taux de dégénérescence ovocytaire et compromettre les résultats de l'ICSI. Certaines patientes avec un taux de recueil ovocytaire élevé peuvent avoir un taux élevé de dégénérescence ovocytaire élevé du fait de la fragilité de la membrane plasmique ovocytaire.

Certaines équipes, pour pallier aux membranes plasmiques ovocytaires trop fragiles ou aux zones pellucides trop résistantes causant une rupture soudaine de la membrane et responsable de taux élevés de dégénérescence ovocytaire, ont mis au point des techniques utilisant le laser avant la microinjection. Celui-ci était déjà utilisé sur la zone pellucide pour améliorer les compétences de l'embryon par le «hatching». En ouvrant et affinant la zone pellucide par le laser avant l'ICSI est né le Laser-ICSI. Par cette technique, des taux de dégénérescence ovocytaire et une amélioration des taux de fécondation ont été retrouvés (123).

2.7.3. Aspiration du cytoplasme

Il est important de s'assurer que le spermatozoïde soit bien déposé dans le cytoplasme de l'ovocyte. Lorsque la micropipette contenant le spermatozoïde à injecter s'avance dans l'ovocyte, elle induit une dépression de la membrane plasmique ovocytaire jusqu'en son centre. Or si la membrane s'est uniquement déformée sans se rompre, le spermatozoïde ainsi déposé va être repoussé dans l'espace périvitellin lorsque la membrane plasmique reviendra à sa position initiale. En aspirant le cytoplasme qui remonte dans la micropipette avec le spermatozoïde, on s'assure de la rupture effective de la membrane plasmique. La systématisation de ce geste a permis d'améliorer les résultats en terme de taux de fécondation.

2.7.4. Influence du système de culture

Il est important de considérer le système de culture plutôt que le milieu de culture seul puisque tous les aspects du système de culture nécessitent d'être optimisés. Il est nécessaire de prendre en compte les chambres d'incubation, le taux d'O₂, l'huile recouvrant le milieu. Les procédures de culture ont beaucoup plus changé que la technique de l'ICSI en elle-même

2.7.4.1. Les milieux de culture

En bref, les milieux de culture spécifiques à l'AMP développés dans les années 80 étaient assez simples, consistant en de simples solutions salées enrichies en sources énergétiques, ou en des solutions complexes avec addition d'acides aminés, de vitamines et de précurseurs d'acides nucléiques. Dans les années 90, des améliorations telles que le retrait du glucose et du phosphate et l'ajout de taurine, citrate, glutamine, et l'EDTA ont été apportées. Gardner et Lane ont montré qu'une séquence d'acides aminés essentiels et non essentiels, associée à des vitamines pendant la phase de développement préimplantatoire fournit un excellent système de culture pour le développement de d'embryons humains viables du stade zygote au stade blastocyste. Il y a encore des points de débat concernant les milieux tels que, l'inclusion de glucose et le taux de phosphate inorganique, la séquence d'acides aminés.

L'addition de facteurs de croissance dans le milieu de culture a montré un bénéfice sur le développement embryonnaire pré-implantatoire. Ceci serait attribué à la diminution de l'apoptose cellulaire. La présence d'IGF1 a montré une réduction de 50% de l'apoptose nucléaire chez les blastocystes. D'autres facteurs de croissance tels que le LIF, le GM-CSF ont démontré leur efficacité pour accroître le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste.

Ces résultats justifieraient une supplémentation des milieux de culture, mais des conditions de sécurité optimales doivent s'appliquer à ces facteurs de croissance exogènes avant une application courante.

2.7.4.2. Influence du pH

La recherche a montré que les fluctuations de température et de pH sont préjudiciables aux ovocytes et au développement des embryons.

La composition du milieu, principalement la concentration de bicarbonate de sodium, et celle en CO₂ de l'atmosphère, déterminent le pH final du milieu. Quinn et al. ont rapporté l'importance de mesurer le pH final du milieu équilibré et d'ajuster la concentration en CO₂ pour améliorer les conditions locales au lieu de se fier uniquement aux recommandations des fournisseurs.

Le pH optimal pour le milieu de culture n'est pas encore établi et les valeurs actuelles sont débattues. Il est accepté que le pH externe du milieu de culture doit être équivalent au pH intracellulaire des blastomères de l'embryon. Le pH intracellulaire de l'embryon préimplantatoire a été déterminé entre 7.0 et 7.3. Les milieux proposent le plus souvent des pH entre 7.2 et 7.3 +/- 0.1 sous 1 atmosphère de pression à la concentration de 6% de CO₂.

2.7.5. Taille de la pipette utilisée pour la microinjection

L'étude de Yavas et al en 2001 a comparé l'efficacité de deux types de pipette d'injection utilisés pour l'ICSI (124). L'une avec un plus grand diamètre intérieur (5-7 μm) et un cône plus court avec ce diamètre intérieur est comparée à une autre avec le plus petit diamètre intérieur possible (3-5 μm) et un cône plus long avec ce diamètre intérieur. Les ovocytes recueillis au stade métaphase II ont été injectés à l'aide de l'une des deux micro-pipette d'injection, en 33 et 94 cycles, respectivement, sur un total de 127 cycles pour 108 patients.

La pipette d'injection avec le plus petit diamètre intérieur possible a augmenté le taux normal de fécondation : 70% (+/- 3,6%) contre 86 %(+/- 2,2) ; (p = 0,001) par rapport à la pipette d'injection avec le plus grand diamètre intérieur (5-7 μm) au cône plus court. Elle a diminué l'incidence de la dégénérescence ovocytaire 14 %(+/- 2,4) vs 5%(+/- 1,4%), (p =0 .001) et celle des zygotes multinucléés 1,0 % contre 0,1%. La pipette d'injection avec le plus petit diamètre intérieur a augmenté le nombre d'embryons diploïdes à J2 de 69% (+/- 3,7%) à 85 % (+/- 2,2)%, (P = 0.001) et le nombre d'embryons diploïdes à J2 de bonne qualité de 67% (+/- 4,0)% à 79% (+/- 2,4)%, (P =0.03), pour tous les ovocytes injectés, et a augmenté le nombre de blastomères par embryon de bonne qualité à J2 : 3,0% (+/- 0,21%) versus 3,8% (+/- 0,12%), (P =. 0003).

Cette étude montre que l'utilisation en ICSI d'une pipette d'injection avec le plus petit diamètre intérieur possible (3-5 μm) au cône plus long avec un plus grand diamètre intérieur permet d'améliorer le taux de fécondation, de réduire l'incidence de la dégénérescence post-injection et celle des zygotes multinucléés et une amélioration du développement des embryons.

2.7.6. Résultats de l'ICSI opérateur-dépendants ?

Rosen et al en 2006 (15) dans leur étude de cohorte ont examiné 6650 ovocytes ayant dégénéré après l'ICSI pour déterminer si le taux de dégénérescence ovocytaire est technicien ou médecin-dépendant. Par des analyses multivariées, l'étude ne retrouve pas d'impact du technicien ou du médecin dans leur étude. Par contre, elle implique le taux de FSH à J3, le nombre d'ovocytes matures à la ponction, le taux d'œstradiol au jour du déclenchement comme facteurs prédictifs indépendants du taux de dégénérescence ovocytaire.

2.8. Approche morphologique et cinétique du développement embryonnaire

Le développement de l'embryon avant l'implantation constitue avec l'implantation l'un des deux événements clés de l'obtention et de l'évolution future d'une grossesse.

Les travaux réalisés au cours des dix dernières années ont contribué soit à hiérarchiser les paramètres utilisés, soit à ouvrir de nouvelles perspectives pour évaluer la qualité embryonnaire.

D Royère et F Guérif en 2008, ont effectué une synthèse de l'état actuel et des perspectives en embryologie clinique (59). Les paramètres concernant la cinétique, comme la morphologie des embryons avant l'implantation, sont intégrés en routine, dans l'arsenal des approches non invasives de la qualité embryonnaire.

Cependant, les données issues des techniques microvidéographiques ainsi que les analyses multivariées réalisées sur des effectifs importants ont conduit à relativiser leur importance.

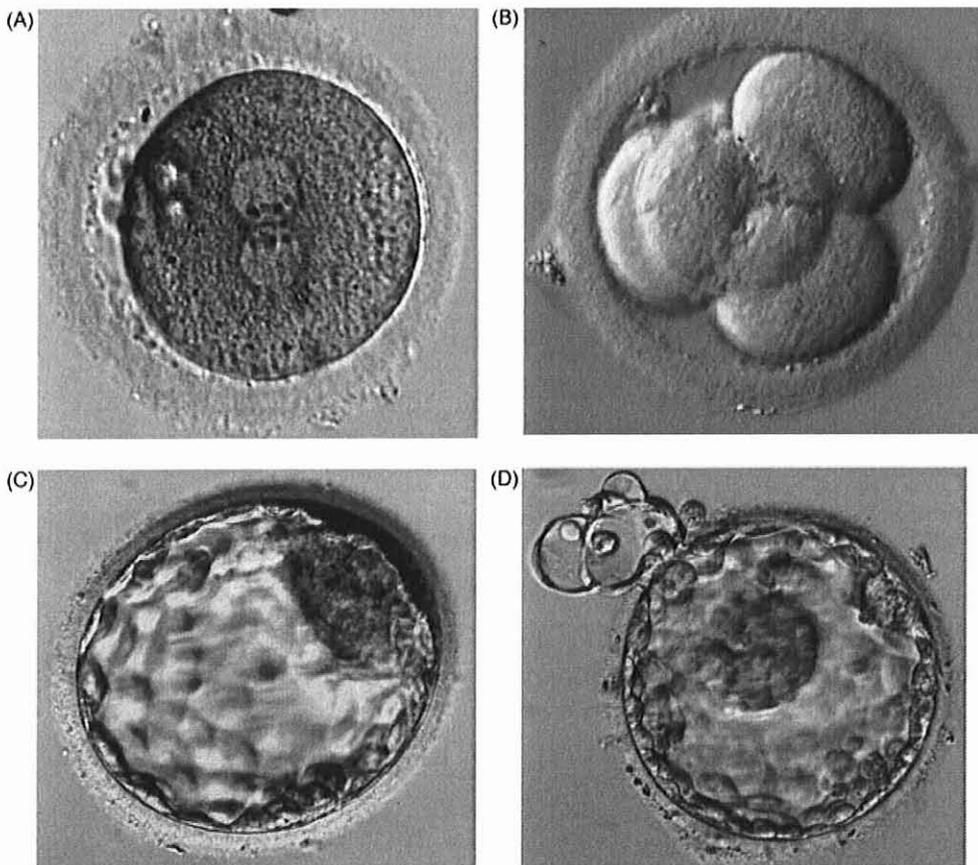


Figure 14 : Aspects morphologiques de l'embryon préimplantatoire

A. Aspect typique de zygote avec apposition des pronuclei et alignement des précurseurs nucléolaires. B. Embryon à j2 « top quality » avec quatre blastomères de taille identique, comportant chacun un noyau unique en interphase, sans exsudat cytoplasmique. C. Blastocyste à j5 expansé, avec une assise continue de cellules trophoblastiques, un bouton embryonnaire compact. D. Blastocyste à j5 en début d'éclosion avec une masse cellulaire interne dense en vue frontale et une assise de cellules trophoblastiques jointives.

2.8.1. Statut morphologique des zygotes et clivage précoce

L'observation en microscopie optique, technique simple et non invasive permet d'évaluer le développement des pronuclei (PN). Les ovocytes sont considérés comme fécondés quand ils contiennent deux pronuclei et anormalement fécondés lorsqu'ils ont trois et plus de pronuclei ou lorsque l'ovocyte a été activé par parthénogenèse (un pronucleus).

L'assemblage, la croissance et la fusion mutuelle de précurseurs nucléolaires (NPB) constituent la phase précoce de nucléogenèse selon une représentation morphologique et chronologique établie pour les zygotes humains. Les zygotes sont classés comme ayant une plus ou moins bonne morphologie selon des critères basés sur le nombre et la distribution des précurseurs nucléolaires.

Un score à J1 a d'abord été proposé par Scott et Smith en 1998, pour intégrer la position des PN, la position des NBP, l'aspect du cytoplasme et la progression vers le premier clivage (125). Ces scores étaient corrélés au taux d'implantation des embryons transférés.

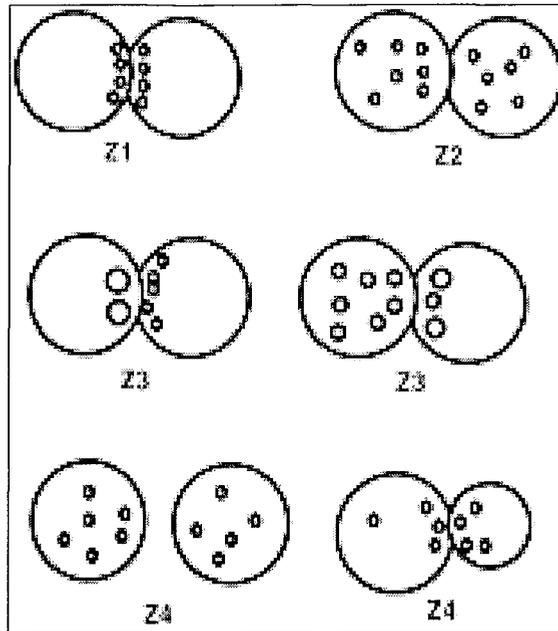


Figure 15 : Classification morphologique des zygotes selon Scott et al. (2000) dans Human Reproduction

Par la suite, ce score initial a été simplifié par les auteurs (classification Z1 à Z4) afin de permettre un usage quotidien. Au même moment, l'équipe de Tesarik a proposé une cotation différente des zygotes à J1 qui incluait le nombre des précurseurs nucléolaires (NPB), leur distribution (polarisée ou non polarisée) dans chaque PN, la taille relative des deux PN et leur position l'un par rapport à l'autre. Six profils morphologiques des PN (profil 0 à 5) étaient distingués ; ils concernaient uniquement les PN de taille identique et apposés l'un à l'autre.

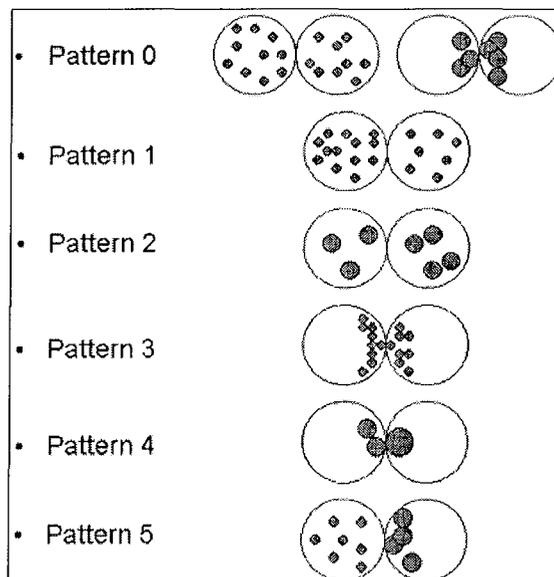


Figure 16 : Classification morphologique des zygotes selon Tesarik & Greco (1999) dans Human Reproduction

Le profil 0 correspondait à des zygotes ayant le potentiel implantatoire le plus élevé. La polarisation des NPB n'est pas observée au tout début du développement des PN mais apparaît progressivement avec le temps par coalescence des NPB donnant naissance à des NPB plus volumineux. De plus, la synchronisation entre les deux PN semble plus importante que la polarité elle-même. Depuis la publication de ces « stadifications » de zygotes, des variantes ont été proposées dans la littérature.

La plupart des observations rapportées sur le statut morphologique des PN a été réalisé 16 à 20 h après insémination ou micro-injection dans la mesure où cette cinétique est influencée par la technique utilisée.

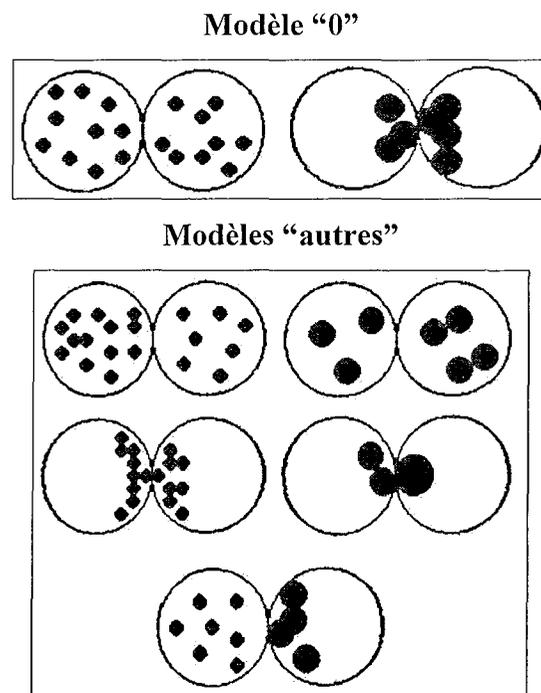


Figure 17 : Classification simplifiée de la morphologie des pronucléi publiée à l'origine par Tesarik et Grecco (2000). Modèle "0": Zygotes montrant le même nombre de précurseurs nucléaires (NPB) répartis uniformément ou de larges NPB avec une répartition polarisée entre les deux pronucléi. **Modèles "autres":** Tous les autres modèles de répartition avec des alignements non-symétriques des NPB incluant la variabilité du nombre de NPB.

Dans une étude concernant plus de 4000 embryons en suivi individuel, en utilisant une version simplifiée des critères proposés par Tesarik et Grecco (profil 0 typique versus profils 1 à 5 atypiques), Guérif et al. ont confirmé l'impact qu'avait le profil atypique des PN sur l'arrêt du développement au-delà de J2 (126). En revanche, le profil typique des PN était associé avec le pourcentage le plus élevé de blastocystes.

La présence d'un halo cytoplasmique lors de l'observation des PN est un marqueur supplémentaire de la viabilité embryonnaire susceptible d'influencer la qualité du futur blastocyste, sans affecter la capacité de l'embryon à atteindre ce stade de développement. Mais cet élément reste débattu (127).

L'apparition ou non du premier clivage est une autre caractéristique analysée à J1, le plus souvent entre 25 à 27 h après la micro-injection (ICSI). La nécessité de décaler le temps d'observation entre FIV classique et ICSI, d'environ 2 heures, pour observer le même taux de clivage est discutée. La micro-injection court-circuite quelques étapes de la fécondation, ce qui en raccourcirait la durée.

De plus, il a été observé que les embryons présentant un premier clivage dès j1 étaient associés à une fréquence accrue d'embryons de « top qualité ».

Un score de qualité embryonnaire non invasif basé sur le délai avant le premier clivage a été introduit par Shoukir et al. en 1997 et Sakkas et al. en 1998 (128, 129). Les zygotes qui atteignent la première division méiotique entre 25 et 27 heures après la micro-injection, embryons au clivage précoce (EC), conduisent à des taux de grossesse doubles et taux d'implantation triples à ceux n'ayant pas présenté un clivage précoce.

Cette observation est en accord avec d'autres études ayant rapporté une meilleure qualité embryonnaire (définie par le nombre de blastomères, la régularité des blastomères, l'absence de multinucléation des blastomères) de la cohorte si un clivage précoce était enregistré 25 à 27 h post-ICSI. Le lien entre ce clivage précoce et le développement qui suit n'est pas définitivement établi mais certaines hypothèses ont été avancées :

- le clivage précoce concernerait des ovocytes présentant une meilleure synchronisation nucléocytoplasmique et moins exposés au risque d'atteindre le seuil minimal critique d'ARNm maternels avant l'activation du génome embryonnaire ;
- la contribution de facteurs paternels est aussi à envisager. Chez l'Homme, les centrioles qui contrôlent les premières divisions mitotiques de l'embryon sont apportés par le spermatozoïde. De plus, chez les bovins où le premier cycle cellulaire influence l'évolution du développement embryonnaire, la formation du pronucleus paternel conditionne la régulation du métabolisme glucidique de l'embryon et le début de la phase S pour le pronucleus maternel (130). Par conséquent, la qualité du spermatozoïde peut être un facteur additionnel influençant le clivage précoce
- les embryons ayant un statut chromosomique aneuploïde se clivent généralement plus lentement (131).

En 2008, Hesters et al ont évalué la morphologie embryonnaire à la première division cellulaire en complément du grade ou score embryonnaire à J2 et ont démontré qu'elle est un facteur prédictif d'implantation et de grossesse (132).

Guérif et al. ont observé que les embryons présentant un 1^{er} clivage à J1 aboutissaient environ deux fois plus souvent à un blastocyste, et ce, avec une cinétique plus rapide que les embryons ne présentant pas ce 1^{er} clivage (126). D'autres études menées dans l'espèce humaine retrouvent que le taux de blastocystes issus d'embryons à clivage précoce à J1 par rapport à des embryons sans clivage précoce est significativement plus élevé à J5.

La sélection par le grade au clivage précoce du zygote peut avoir un impact sur la pratique quotidienne en améliorant la sélection de l'embryon notamment lors du remplacement d'un seul embryon (SET).

2.8.2. Zygotes à pronucléi multiples

L'apparition d'un nombre élevé de zygotes triploïdes après ICSI représente un facteur péjoratif de l'ICSI.

Une étude de Young et al. en 2000, sur les paramètres liés aux taux élevés de zygotes multipronucléés en ICSI, montre que les patients avec une forte incidence de zygotes triploïdes ont besoin d'un nombre significativement plus élevé d'ampoules de gonadotrophines et leur pic d'œstradiol est plus faible que celui des cas contrôles. En outre, les taux de fécondation étaient significativement plus bas, et bien que la qualité des embryons et que le taux de grossesses cliniques soient plus faibles, elles ne sont pas significatives.

L'équipe de Rosen en 2004, a remarqué une augmentation des taux de zygotes à 3 pronucléi (3PN) en ICSI chez les femmes ayant une qualité médiocre des ovocytes, caractérisée par un cytoplasme granuleux, une membrane plasmique fragile et un globule polaire fragmenté (133). Ils suggèrent que le taux de zygotes à 3 PN peut être un marqueur objectif de mauvaise qualité ovocytaire. Afin de déterminer si des paramètres cliniques peuvent influencer sur ce taux, ils ont tenté d'évaluer l'impact de la stimulation ovarienne sur les taux de zygotes à 3PN.

Après avoir ajusté l'âge et le nombre de follicules de grande taille (18 mm), l'étude a montré une corrélation significative entre le nombre total de jours de stimulation et le taux de zygotes à 3PN ($p = 0,05$). Le taux de zygotes à 3PN est plus faible lors d'un déclenchement par hCG entre le 10^{ème} et 12^{ème} jour. Dans les situations où l'hCG est retardée au-delà de 12 jours, lorsqu'au moins 2 gros follicules étaient déjà présents, une augmentation significative du taux de zygotes à 3 PN est retrouvée.

Ni l'âge, ni la dose totale de gonadotrophines administrées, ni le taux d'E2 le jour du déclenchement par hCG, ni le nombre total d'ovocytes ponctionnés, ni le technicien de l'ICSI n'étaient significativement associés au taux de zygotes à 3PN.

En se basant sur cette augmentation des taux de zygotes à 3PN en ICSI comme marqueur objectif de la qualité des ovocytes, l'étude conclue que prolonger la stimulation au-delà de 12 jours, pour augmenter le nombre d'ovocytes matures, peut nuire à la qualité des ovocytes et diminuer les zygotes à 2PN utilisables en ICSI (134).

2.8.3. Statut morphologique à J2/J3

2.8.3.1. L'embryon « top quality »

Une bonne qualité embryonnaire ou embryon « top quality » peuvent être définis par un taux de clivage à 4 cellules à J2 ou 8 cellules à J3, des blastomères de taille égale, une fragmentation de l'embryon inférieure ou égale à 20 % et l'absence de blastomère polynucléé (135).

2.8.3.2. Critères d'évaluation à J2/J3

Le développement embryonnaire précoce a fait l'objet d'une grande attention dès le début de l'AMP, pour plusieurs raisons. D'abord, il s'est avéré plus efficace de transférer l'embryon dès son deuxième jour de développement plutôt qu'au stade de développement correspondant à son arrivée dans l'utérus (blastocyste), car les conditions de ce développement n'étaient alors pas maîtrisées. Ensuite, avec l'essor rapide des stimulations plurifolliculaires, le problème du choix des embryons à transférer s'est posé et en conséquence, l'appréciation du potentiel implantatoire de l'embryon pour orienter ce choix.

L'influence pronostique de la morphologie des embryons à J2 ou à J3 a été évaluée soit lors de transferts embryonnaires uniques, soit lors de transferts embryonnaires multiples homogènes, soit lors de transferts embryonnaires multiples hétérogènes mais, dans ce dernier cas, en définissant des scores visant à évaluer globalement la morphologie des embryons transférés.

Différents critères pronostiques ont émergé de ces études comme des données plus récentes issues des transferts sélectifs d'un embryon : le nombre, la taille et la forme des blastomères, la proportion de fragments anucléés, la présence de blastomères multinucléés (136).

Après deux jours de culture le stade 4–5 cellules, après trois jours de culture le stade 6–8 cellules sont associés avec les meilleures chances d'implantation.

À ce stade de clivage, des embryons présentant pas ou peu de fragmentation et une absence de blastomère multinucléé ont un taux plus élevé d'implantation que des embryons ayant un ou plusieurs blastomères multinucléés et/ou présentant plus de fragmentation.

Par la suite, des analyses vidéomicrographiques ont attiré l'attention sur le caractère dynamique du développement embryonnaire en relativisant la signification de l'observation de fragments ou exsudats cytoplasmiques à un moment donné du développement même si leur impact en pratique clinique reste spéculatif (137).

L'évaluation combinée de la morphologie de l'embryon à J2 ou J3 associée au score de morphologie des pronucléi améliore la sélection des embryons à transférer. (138)

2.8.4. Culture prolongée au stade de blastocyste

Bien que la culture prolongée de l'embryon humain jusqu'au stade de blastocyste (J5/J6), situation la plus physiologique pour l'arrivée de l'embryon dans l'utérus, ait été proposée dès les premiers développements de la FIV, elle ne s'est réellement développée qu'avec les cocultures puis les milieux séquentiels. Sa place dans la stratégie de transfert reste cependant l'objet de controverse (139). Ses défenseurs argumentent sur la capacité de la culture prolongée à sélectionner les embryons les plus compétents au développement.

Des critères morphologiques incluant la taille de la cavité, la densité et la continuité de l'assise cellulaire trophoblastique, la densité et la cohésion du bouton embryonnaire, ont été reliés avec le potentiel implantatoire du blastocyste.

Les raisons de la perte d'environ la moitié des embryons pendant cette période préimplantatoire restent mal comprises, même si des anomalies chromosomiques, une expression inadaptée du génome embryonnaire, des conditions de culture non optimales ou une maturation ovocytaire inadéquate ont pu être avancées.

2.8.4.1. Développement au stade de blastocyste comme critère additionnel de réussite en ICSI?

Si le débat reste ouvert, des éléments de réponse sont tout de même disponibles. Le premier concerne l'évaluation des aneuploïdies sur les embryons précoces et leur devenir au cours du développement préimplantatoire (140). Les embryons capables d'atteindre le stade de blastocyste ont un pourcentage d'euploïdie plus élevé que les embryons arrêtant leur développement (65 % versus 24 %) même si cela ne concerne ni les mosaïques, ni certaines monosomies ou trisomies. Le second résulte de l'analyse hiérarchisée, des critères de

développement de l'embryon, précédemment rapportée (126). En effet, non seulement la contribution des critères morphologiques précoces pour prédire la capacité de l'embryon à poursuivre son développement reste faiblement discriminative, mais aussi, une fois atteint le stade de blastocyste, la capacité d'implantation de celui-ci ne dépend plus de critères précoces du développement.

2.8.5. Approches fonctionnelles de la compétence au développement

Associées à ces critères morphologiques, des approches fonctionnelles deviennent envisageables. Elles concernent l'ovocyte ou l'embryon, d'une part, l'environnement de l'ovocyte avant la fécondation, ou l'embryon avant son implantation d'autre part. Les approches non invasives s'appuyant sur la métabolomique comme la protéomique sont prometteuses.

L'émergence des techniques en « -omique » n'a pas seulement concerné de nombreux secteurs de la pathologie humaine, elle s'est aussi déployée dans le champ du développement embryonnaire comme de l'implantation. Il convient de distinguer les approches directes sur l'ovocyte et l'embryon, invasives et qui conservent un caractère expérimental, des approches indirectes sur l'environnement de l'embryon, non invasives, qui pourraient être accessibles en pratique clinique.

2.8.5.1. Approche transcriptomique sur l'embryon

Expérimentée chez les animaux d'élevage, cette approche a permis de distinguer des gènes dont le niveau d'expression est corrélé avec l'échec d'implantation de l'embryon lors de l'implantation (TNF α , par exemple) de gènes dont le niveau d'expression est relié à la poursuite de la gestation (CDX2 facteur transcriptionnel impliqué dans l'implantation et le développement placentaire), voire de gènes dont le niveau d'expression est relié avec la survenue comme la poursuite de la gestation (TXN, la thiorédoxine). Cette stratégie a été utilisée expérimentalement chez l'homme à partir de biopsies trophoblastiques réalisées sur des blastocystes dont l'implantation était ensuite vérifiée sur la base d'une identification génétique de type fingerprint. Il a été ainsi possible d'identifier des gènes impliqués dans l'adhésion ou la communication cellulaire et dont le niveau d'expression était relié à l'implantation (141).

2.8.5.2. Approche protéomique

L'approche protéomique peut être invasive, concernant directement l'embryon, mais aussi non invasive lorsqu'elle concerne l'étude du milieu environnant de l'embryon. Les premiers résultats ouvrent des perspectives sur l'identification de marqueurs de développement ou d'arrêt du développement (142).

2.8.5.3. Approche métabolomique

Elle s'appuie sur l'identification de certains métabolites par des techniques de spectroscopie Raman ou proches de l'infrarouge. Des profils compatibles avec un potentiel de développement et/ou d'implantation de l'embryon peuvent ainsi être caractérisés, permettant d'établir de véritables scores de viabilité (143). Les approches développées récemment sur la respirométrie de l'embryon, mesurant la vitesse de consommation d'oxygène de l'embryon, sont également une source d'informations discriminantes dans certains modèles bovins (144). Les approches fonctionnelles sont prometteuses sans qu'il soit possible d'indiquer laquelle ou lesquelles entreront dans la pratique clinique.

2.8.5.4. Développement embryonnaire préimplantatoire : quelles perspectives ?

Il est encore difficile de prévoir parmi tous les critères de développement présentés, ceux qui seront à la fois robustes, fiables et transposables en pratique clinique. Cependant l'apport intellectuel de ces résultats est indiscutable. Cette réflexion est indissociable de l'étude des mécanismes impliqués dans le processus de l'implantation. Au total, de plus en plus d'observations illustrent le fait que « l'embryon capable de s'implanter » doit suivre un profil d'expression génique, protéique et métabolique dans une chronologie précise sans à-coups et sans stress (« Quiet embryo » (145)).

2.9. L'avenir pour l'ICSI

2.9.1. Une amélioration des techniques de sélection des gamètes

2.9.1.1. Sélection des spermatozoïdes avec l'acide hyaluronique

2.9.1.1.1. Intérêt de l'acide hyaluronique

Au cours de la fécondation naturelle, l'acide hyaluronique (AH) semble jouer un rôle central dans la sélection physiologique du spermatozoïde. En effet, l'AH est normalement présente sur la matrice extracellulaire du cumulus oophorus entourant l'ovocyte. Celle-ci est une formidable barrière que seul le spermatozoïde mature, ayant exposé ses récepteurs spécifiques

pour se lier à l'AH et la digérer, peut dépasser pour atteindre et pénétrer la zone pellucide et féconder l'ovocyte.

Les spermatozoïdes capables de se lier de façon permanente à l'acide hyaluronique in vitro sont matures et ont terminé leur processus de spermiogénèse : le remodelage de la membrane plasmique, l'expulsion du cytoplasme et la maturation nucléaire, selon l'étude de Huszar en 2003.

La maturation spermatique conduit à la formation des sites de liaison à l'AH et à la zone pellucide ovocytaire. Les spermatozoïdes matures possèdent une densité élevée de sites de liaison à l'acide hyaluronique.

Au contraire, les spermatozoïdes immatures avec un déficit de remodelage de la membrane plasmique n'ont pas cette capacité à se lier à l'AH (146). Les spermatozoïdes immatures montrent aussi une plus grande rétention d'enzymes cytoplasmiques comme la créatine kinase, un niveau de peroxydation lipidique augmenté, une fragmentation de l'ADN en conséquence ainsi qu'une proportion d'anomalies morphologiques plus importante (147).

De plus, les spermatozoïdes dont la maturité est arrêtée, ont une expression plus faible de la protéine de choc HspA2, ce qui peut causer des anomalies de la méiose et peut être corrélé à des aneuploïdies méiotiques. Ceci peut expliquer le fait que la fréquence des aneuploïdies chromosomiques soit réduite de 5.4 fois chez les spermatozoïdes matures capables de se lier à l'acide hyaluronique par rapport à ceux immatures qui n'ont pas cette capacité (148).

Il a été démontré que la micro-injection de spermatozoïde couvert d'acide hyaluronique n'avait pas d'effet négatif sur le développement du zygote.

2.9.1.1.2. Amélioration de la sélection des spermatozoïdes pour l'ICSI

Associé à la morphologie, l'équipe de Sakkas à partir de 2003(146) puis Ubaldi en 2008 (104) et Parmegiani en 2009 (149) ont suggéré que la sélection des spermatozoïdes peut être améliorée sur la base de sa capacité biochimique à se lier à l'acide hyaluronique.

L'étude de Parmegiani, basée sur ces connaissances a eu pour but de mieux définir le rôle de l'acide hyaluronique dans la sélection des spermatozoïdes à chromatine normale pour optimiser les résultats de l'ICSI.

2.9.1.1.2.1. Diminution du DFI

Une 1^{ère} étude a retrouvé une diminution de la fragmentation de l'ADN spermatique chez les spermatozoïdes sélectionnés par leur capacité à se lier à l'acide hyaluronique (5.3% ; p<

0.001) par rapport aux spermatozoïdes sélectionnés frais (16.5%) sans préparation, après lavage ou après un bain de PVP (11.5%). Cette sélection aboutit à une diminution significative de l'ADN fragmenté chez les spermatozoïdes sélectionnés(149).

2.9.1.1.2.2. Amélioration des critères morphologiques

Leur 2^e étude (149) a comparé la morphologie des spermatozoïdes par les critères MSOME définis par Bartoov (grossissement x 6300) après une préparation par gradient de densité puis, immersion dans une goutte de PVP pour un 1^{er} groupe, ou immersion dans un aliquot de milieu contenant l'acide hyaluronique après 15 min d'incubation à 37°C dans le 2nd groupe. Un taux de normalité tenant compte de l'aspect et de la taille du noyau, de la présence de vacuoles et de l'aspect de la chromatine est établi en examinant 100 spz par patient.

Ce taux de normalité est significativement supérieur chez les spermatozoïdes sélectionnés par leur capacité à se fixer à l'acide hyaluronique, par rapport à ceux sélectionnés après un bain de PVP.

La procédure de l'IMSI est très chronophage : la sélection d'un spermatozoïde normal par les critères MSOME peut nécessiter 60 à 120min. Cette étude pose l'hypothèse d'un gain de temps pour la sélection de spermatozoïde à noyaux normaux pour l'ICSI par la sélection par la liaison à l'acide hyaluronique.

2.9.1.1.2.3. Amélioration des résultats de l'ICSI

La 3^e étude (149) a comparé les résultats de l'ICSI après sélection du spermatozoïde sous PVP (PVP-ICSI) et après une immersion dans un milieu contenant de l'acide hyaluronique (AH-ICSI). Un taux de développement embryonnaire a été défini pour définir le taux de croissance des embryons transférés. Le taux d'embryons de bonne qualité dans le groupe AH-ICSI est significativement supérieur (35.8%) à celui du groupe PVP-ICSI (24.1%). Le taux de développement embryonnaire est significativement supérieur (95+/-0.8) dans le groupe AH-ICSI par rapport au groupe PVP-ICSI (84+/-1.1 ; p<0.001). De plus, même si la différence n'est pas significative, une tendance à des taux de fécondation, de grossesse et d'implantation plus élevés est retrouvée dans le groupe AH-ICSI.

Si ces études concluent à une amélioration de la sélection du spermatozoïde avec noyau et ADN normaux par cette technique à l'acide hyaluronique et donc à une optimisation des résultats de l'ICSI, mais elles soulignent que d'autres études prospectives randomisées sont nécessaires pour valider les résultats préliminaires.

2.9.2. Les échecs d'activation ovocytaire

Souza en 1994 a analysé au microscope électronique les ovocytes en échec de fécondation 44h après l'ICSI (150).

Tous sont restés au stade de métaphase II. Les 1^{ers} Globules polaires contenaient de nombreux granules corticaux et chromosomes regroupés, encore associés aux microtubules. Lorsque le 2nd globule polaire est présent, il présente les mêmes caractéristiques que le 1^{er} indiquant qu'il résulte de la fragmentation de ce 1^{er} globule polaire et non d'une 2^{nde} division méiotique. Dans le cytoplasme ovocytaire prédominent le réticulum endoplasmique lisse et les mitochondries. Dans le cortex ovocytaire, les granules corticaux étaient intacts sans signe de réaction corticale débutante ou incomplète. Les chromosomes ovocytaires étaient retrouvés à la périphérie de l'ovocyte à proximité de l'extrusion du 1^{er} globule polaire, consistant en de denses agrégats associés aux microtubules. La chromatine des spermatozoïdes était partiellement décondensée.

Ces données ont suggéré que l'échec de fécondation après ICSI est essentiellement dû à un échec d'activation ovocytaire.

2.9.2.1. Fécondation et activation ovocytaire

Le spermatozoïde ayant pénétré la membrane ovocytaire, le noyau spermatique se décondense et se transforme en pronucléus mâle. L'ovocyte complète sa 2^e division méiotique et se forme le pronucléus femelle. Une synthèse d'ADN se produit dans les deux pronucléi avant leur union, suivie de la 1^{ère} division mitotique.

Lors de la fécondation, une série d'événements intracellulaires est suggérée pour permettre au spermatozoïde de surmonter l'arrêt de l'ovocyte en métaphase II, il s'agit de l'activation ovocytaire induite par le spermatozoïde.

L'interaction entre le spermatozoïde et la membrane plasmique ovocytaire induit une augmentation du Ca²⁺, issu des stocks intracellulaires, suivie d'une série d'élévation du Ca²⁺ de grande amplitude et de courte durée : les oscillations calciques. Le Ca²⁺ est un second messager qui transmet le signal spermatique afin de poursuivre la seconde division méiotique. Les mécanismes moléculaires de la régulation du cycle cellulaire ne sont pas encore clairs. L'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire induit la réaction corticale qui se manifeste par un largage de granules corticaux dans l'espace péri-vitellin permettant le blocage de la polyspermie. Le pH intracellulaire, qui devient plus alcalin participe à cette activation ovocytaire.

Deux hypothèses sont suggérées pour permettre l'activation de l'ovocyte par le spermatozoïde. La première est celle d'une liaison spécifique du spermatozoïde à un récepteur sur l'oolemme qui, couplé à une protéine G ou par un récepteur à tyrosine kinase, permet la transduction du signal. L'autre hypothèse est celle de la libération d'un facteur soluble spermatique, parfois appelé oscilline, lors de la fusion des membranes ovocytaire et spermatique ou lors de la micro-injection du spermatozoïde dans l'ovocyte. Ce facteur serait capable d'induire les événements précoces de l'activation ovocytaire en déclenchant le pic précoce de Ca^{2+} et les oscillations calciques.

Les échecs de fécondation en ICSI pourraient être liés à un déficit partiel ou total en ce facteur spermatique ou à une incapacité ovocytaire à être activée. Plusieurs études ont obtenu des fécondations après échecs répétés en ICSI par une activation ovocytaire par des ionophores calcique ou des stimulations électriques ovocytaires.

2.9.2.2. L'activation ovocytaire par des ionophores calciques

Gearon en 1995, a étudié l'activation ovocytaire et la fécondation chez des ovocytes non fécondés en ICSI (151). Des spermatozoïdes de faible viabilité ont été injectés dans des ovocytes, âgés 24 h après la ponction, en présence et en absence de calcium. Des preuves d'activation ovocytaire et de fécondation ont été recherchées 16-19 h après l'injection. Des injections sans spermatozoïdes ont également été effectuées pour évaluer l'effet de la procédure d'injection elle-même et la présence de calcium sur l'activation ovocytaire.

Les spermatozoïdes peu viables injectés en présence de 1,78 mM de calcium ont été normalement capables de fécondation chez ces ovocytes âgés et les zygotes ont débuté leur clivage. Aucun des ovocytes injectés avec ces spermatozoïdes en l'absence de calcium n'ont été fécondés normalement, de plus, les taux d'activation ovocytaire selon les différents protocoles sous calcium soient similaires.

Terada en 2009, dans son étude, reporte un cas de grossesse réussie en ICSI après une activation artificielle de l'ovocyte par ionophore calcique, l'ionomycine, chez un couple avec une oligoasthénospermie sévère et sept échecs de fécondation en ICSI (152).

2.9.2.3. L'activation ovocytaire par modification de la micro-manipulation en ICSI

Tesarik en 2002 dans une étude six cas, a tenté de surmonter l'échec d'activation ovocytaire d'origine spermatique ou ovocytaire en modifiant la technique de micro-injection d'ICSI (153). Ces modifications techniques de la micromanipulation consistent en une aspiration

vigoureuse du cytoplasme, répétée avec un mouvement de va et vient du cytoplasme dans l'aiguille, suite à la rupture de l'oolemme, lorsque la pointe de l'aiguille d'aspiration est au centre du cytoplasme. La micro-injection du spermatozoïde se fait à proximité de la membrane plasmique, à l'opposé du point de rupture membranaire. Moins de 10 à 30 min après l'ICSI, certains ovocytes micro-injectés sont plongés dans un milieu de culture contenant un calcium ionophore. Ceci a pour but de faciliter l'augmentation du calcium intracellulaire.

En comparant cette procédure à la procédure classique, ils ont obtenus plus d'activations ovocytaires et d'embryons de bonne qualité. Cette équipe suggère que cette technique soit une alternative à l'utilisation de calcium ionophore pour pallier l'échec d'activation ovocytaire. En effet, l'utilisation de calcium ionophores est limitée par la connaissance insuffisante de leur cytotoxicité, leur effet tératogène et mutagène.

2.9.2.3.1. L'activation ovocytaire piezzoélectrique

Baltaci et al ont étudié l'activation piezzoélectrique des ovocytes en cas d'échec complet de fécondation en ICSI (154). L'étude compare les résultats de l'ICSI « classique » avec ceux d'un protocole d'ICSI associée à l'activité piézzoélectrique chez un groupe de patients ayant essuyé un échec de fécondation en ICSI (Groupe A : N=21) et un groupe ayant essuyé plusieurs échecs d'ICSI (Groupe B: N=50). Dans ce groupe A, l'activation ovocytaire piezzoélectrique est appliquée à 58% des ovocytes en métaphase II. Le taux de fécondation en ICSI dans le groupe A est de 62% dans ce protocole contre 12% en protocole classique. Le taux de fécondation obtenu dans le groupe B, sur les 612 ovocytes en métaphase II est de 48%. Dans cette étude l'activation ovocytaire piézzoélectrique semble améliorer les résultats de l'ICSI.

2.9.3. Recherche de modèles de prédiction statistique de l'issue de la tentative d'ICSI

De plus en plus d'équipes essaient d'établir des modèles prédictifs de l'issue des techniques d'AMP.

L'équipe de Van der Steeg (155) fournit un modèle de prédiction de grossesse spontanée dans l'année qui suit la première consultation d'aide médicale à la procréation, en se basant sur l'âge de la femme, le délai d'infertilité, le type d'infertilité primaire ou secondaire, l'état tubaire, le nombre de spermatozoïdes mobiles, la présence ou non d'un test de Hühner. Celui-ci n'est valable qu'en cas d'OAT non sévère (nombre de spermatozoïdes mobiles après

préparation > 3 Millions) et d'absence de pathologie tubaire bilatérale. Font suite un modèle de prédiction de grossesse en insémination intra-utérine puis en FIV en cours d'exploitation.

Wald et al. ont tenté de développer un modèle prédictif. Leur étude rétrospective a été conduite chez 113 patients bénéficiant de l'ICSI dans le cadre d'une infertilité masculine sévère avec recueil chirurgical de spermatozoïdes (156). Les données étudiées comprenant l'âge maternel, le type de technique chirurgicale de recueil, le type de spermatozoïde utilisé, les paramètres spermiologiques et le type d'infécondité. Les résultats ont montré que l'âge maternel est le facteur le plus prédictif de grossesse ($P = 0.025$), suivi du type de sperme utilisé ($P = 0.076$). Le type d'infécondité masculine ($P = 0.47$) et la technique chirurgicale de recueil ($P = 0.88$) ne sont pas des facteurs prédictifs.

Ces études ont pour but d'établir des échelles et des scores prédictifs. En relatant le déroulement de l'ICSI, le praticien pourrait expliquer au couple leurs chances de réussites adaptées au cas par cas, ainsi que les facteurs qui influencent le résultat de l'ICSI.

Mais d'autres études doivent être conduites pour une mise en pratique de ces résultats préliminaires.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE PERSONNELLE NANCEENNE

1. Objectifs de l'étude :

L'objectif principal de cette étude est d'identifier les principaux facteurs clinico-biologiques corrélés à l'absence de remplacement embryonnaire en ICSI. L'absence d'embryon permettant un remplacement embryonnaire intra-utérin se produit soit en cas d'échec complet de fécondation par l'ICSI, sans obtention d'embryon, soit en cas d'obtention d'embryon dont la qualité ne permet pas un remplacement intra-utérin.

Une fois identifiés, l'objectif est de décrire la fréquence de ces paramètres au sein des groupes cas et témoins, de définir s'ils sont significativement associés au risque d'absence de remplacement embryonnaire en ICSI.

L'objectif secondaire est d'extraire, parmi ces paramètres, ceux sur lesquels le patient, le clinicien, le biologiste ou le technicien ont une incidence pour permettre une amélioration de la prise en charge en amont ou pendant la tentative d'ICSI.

2. Matériel et Méthode :

2.1. Description de l'étude

Ce travail est une étude rétrospective de type cas-témoins sur une durée de quatre ans, de janvier 2004 à décembre 2008, ceci pour une homogénéité de pratique de la technique de l'ICSI dans notre centre, en rapport avec notre pratique actuelle ainsi que pour une homogénéité du recueil des données.

En utilisant la base de données de FIVNAT et les dossiers cliniques, sont étudiés deux groupes de patients suivis au centre d'Aide Médicale à la Procréation de la Maternité Pinard de Nancy.

2.2. Inclusion des patients

Le groupe de cas « d'absence de remplacement embryonnaire » comprend les 36 tentatives d'ICSI n'ayant pu aboutir au remplacement d'au moins un embryon de bonne qualité de janvier 2004 à décembre 2008. La période de 2004 à 2008 a été choisie pour une homogénéité de la pratique de l'ICSI et pour une plus grande homogénéité du recueil de données.

Le groupe des cas est subdivisé en 2 sous-groupes. Le 1er groupe comprend 24 tentatives ayant abouti à un échec complet de fécondation, sans embryon. Le 2nd groupe comprend 12 tentatives ayant permis l'obtention d'un à plusieurs embryons dont la qualité est insuffisante

pour un remplacement embryonnaire intra-utérin, selon notre score embryonnaire (fragmentation de 50%, grade IV).

Le groupe témoin de fécondation réussie par ICSI, comprend 71 couples tirés au sort, pour lesquels la tentative d'ICSI a permis le remplacement d'au moins un embryon, c'est-à-dire d'un embryon dont le score embryonnaire est suffisamment satisfaisant pour considérer le remplacement, sans anomalie numérique des pronucléi ni blocage de division avec un taux de fragmentation <50%. Le nombre de témoins a été choisi double à celui des cas pour améliorer la puissance de l'étude.

Ces deux groupes sont appariés selon l'âge maternel. Après avoir effectué une revue de la littérature, ce critère d'appariement a été choisi délibérément, du fait de l'unanimité des auteurs à son sujet. Il s'agit du principal paramètre clinique influençant l'issue de l'ICSI. L'appariement selon le critère de l'âge maternel a permis de s'affranchir d'un critère prédominant dans l'espoir de démasquer certains facteurs moins étudiés.

2.3. La procédure de FIV- ICSI du laboratoire de FIV de la Maternité régionale de Nancy

Cette procédure définit le traitement et la mise en fécondation des ovocytes d'une patiente après ponction folliculaire par injection intra-cytoplasmique d'un spermatozoïde, afin d'obtenir des embryons à transférer in utéro.

2.3.1. Recueil des ovocytes :

Toutes les boîtes contenant les milieux de culture, sont préparées la veille de leur utilisation et disposées à l'étuve 37°C à 5% de CO₂ afin de permettre un bon gazage des différents milieux de culture et équilibrage de l'huile minérale.

Le jour de la ponction, à J 0 :

La manipulation nécessite le port de gants non stériles lavés à l'eau et essuyés, sous hotte à flux en marche, ainsi que le port d'un masque.

Les seringues, qui sont préalablement rincées au milieu de rinçage à 37°C avant l'aspiration des follicules, contiennent le liquide folliculaire prélevé au bloc opératoire. Elles sont déposées sur un champ stérile dans le sas bloc-labo sur une platine thermostatée à 37°C.

Les liquides folliculaires déposés dans des boîtes de Pétri diamètre 100 sont observés immédiatement, sous la loupe binoculaire.

Les complexes cumulo-ovocytaires (CCO) sont recherchés et leur taille est appréciée au microscope optique avant le prélèvement, à l'aide de pointes de pipettes automatiques stériles.

Les CCO sont déposés dans une petite boîte de Pétri, contenant 2 ml de milieu de culture, maintenue à 37°C sur platine chauffante de la hotte.

Un peu de liquide folliculaire de chaque seringue, prélevé stérilement dans un tube à hémolyse stérile, est gardé jusqu'à J2 à température ambiante en vue d'une culture bactérienne en cas de suspicion d'infection des milieux de culture.

La boîte de Pétri est mise à l'étuve à 37°C et 5% de CO₂ dès la fin de la ponction.

2.3.2. Recueil et préparation du sperme :

La préparation de sperme en FIV ICSI a pour but d'obtenir une concentration maximale de spermatozoïdes féconds.

Après 30 mn de liquéfaction à l'étuve CO₂, le volume du recueil de sperme est noté, puis sont effectués une évaluation de la mobilité et une numération.

Si le pourcentage de spermatozoïdes fléchants est supérieur à 20% et que la numération de spermatozoïdes est supérieure à 1 million par ml, on utilise la même technique que dans le cas d'une préparation de sperme FIV standard.

Si le pourcentage de fléchants est inférieur à 20% et que la numération de spermatozoïdes est inférieure à 1 million par ml, on utilise la technique dite de « lavage ». Pour la technique de lavage, la totalité du recueil est centrifugée pendant 15 mn avec 4 ml de Flushing Médium, dans un tube conique, à 358 G (1500 tr/min). Le surnageant est enlevé. Le culot est récupéré dans l'IVF ou Global de 0,1 à 1 ml selon la densité du culot.

25 ml de pentoxyfiline sont ajoutés si le nombre de spermatozoïdes dans le sperme frais est inférieur à 500 000/ml et/ou la mobilité de classe A est inférieure à 5% sur le sperme frais, au maximum 1h avant l'ICSI.

Un test de mobilité est effectué et éventuellement 1 étalement avec une coloration de Harris Shorr si la quantité de spermatozoïdes est suffisante (>1 million)

La préparation est placée à l'étuve à 37°C à 5% de CO₂ jusqu'à la microinjection.

Le sperme est préparé au labo de FIV ou préparé avant son acheminement.

2.3.3. Conditionnement des ovocytes :

La décoronisation des ovocytes permet d'isoler l'ovocyte des cellules folliculaires qui l'entourent. Celle-ci est nécessaire et s'effectue sous la hotte en marche, sans gant, avec un masque. 0,2 ml de hyaluronidase (synvitro hyadase Médicult) et 0,2 ml d'IVF sont versés dans les puits 1 et 2 d'une boîte de 4 puits. La dilution peut être réalisée dans un tube 2 positions avant de verser 0,4 ml de cette préparation dans les 2 premiers puits.

On verse 0,8 ml d'IVF dans le puits 3 et 0,8 ml de Global dans le puits 4.

Les ovocytes sont prélevés dans leurs cumulus et déposés dans le puits 1 (maximum 6 à la fois) pour effectuer des aspirations et refoulements du liquide à l'aide de la pipette automatique pendant quelques secondes. Les ovocytes sont passés successivement dans les 2 puits. L'opération ne dure pas au total plus de 2 minutes.

Ils sont rincés dans le puits d'IVF puis placés pour finir dans le puits 4.

La boîte est remise à l'étuve à 37°C et à 5% de CO₂.

2.3.4. Préparation de la boîte pour réalisation de l'ICSI et mise en gouttes des ovocytes :

Dans le couvercle d'une boîte de Pétri Falcon de 6 cm, sont déposées en colonne autant de gouttes numérotées de 7µl de Global qu'il y a d'ovocytes à injecter. Les ovocytes sont rincés dans une ou deux gouttes de 20 µl de Global, avant de les disposer dans les gouttes numérotées.

A proximité des gouttes numérotées, on dispose une goutte de 10µl de PVP pur non étalée pour le rinçage des aiguilles et d'autres étalées finement pour la migration des spermatozoïdes.

La boîte est recouverte de 4,5 ml d'huile minérale déposée délicatement à l'aide d'une pipette de 5 ml stérile puis elle est placée à l'étuve.

Boîte d'ICSI :

sous huile minérale détoxifiée
(4,5 ml).

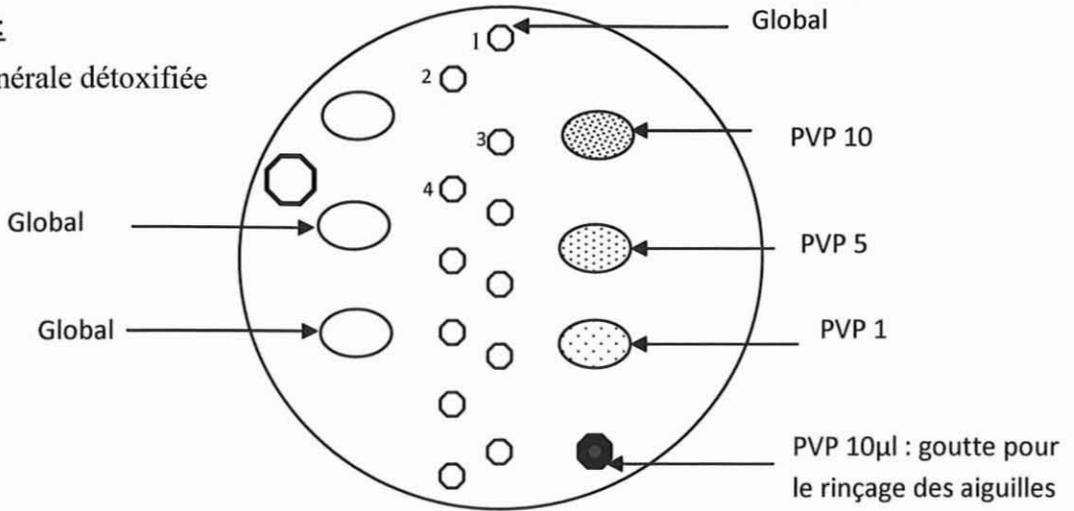


Figure 17 : Schéma de la boîte de Pétri pour la réalisation de l'ICSI et la mise en gouttes des ovocytes. Dépôt des gamètes dans les différentes gouttes numérotées

Les ovocytes sont déposés après rinçage dans le Global un par un dans les gouttes verticales numérotées.

Les spermatozoïdes sont déposés, après appréciation de leur concentration au microscope dans les gouttes de PVP.

2.3.5. Réalisation de la micro-injection selon la procédure d'ICSI

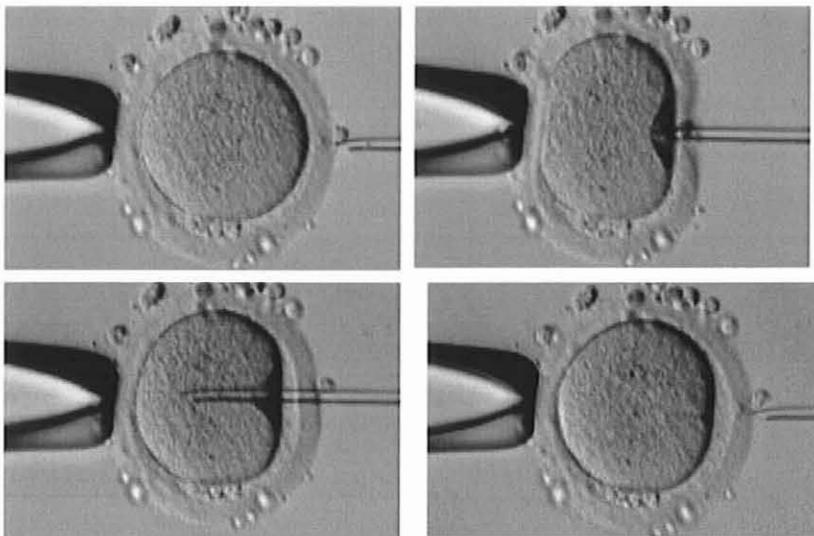


Figure 18 : Réalisation de la microinjection

Après l'ICSI, chaque ovocyte est placé dans une goutte numérotée de 80 µl de Global sous huile, dans une boîte Falcon étiquetée 60 mm testée en embryotoxicité.

Les ovocytes peuvent être laissés dans la même goutte jusqu'à J5 sans changement de milieu.

2.4. Données recueillies pour l'étude

Pour chacune des tentatives, les paramètres suivants ont été pris en compte :

Concernant le couple, sont notés le rang de l'ICSI, l'indication, la durée d'infertilité du couple, l'échec préalable d'inséminations intra-utérines, le caractère primaire ou secondaire de leur infertilité, la consommation de tabac ou d'autres toxiques, le caryotype de chacun, l'indice de masse corporelle de chacun.

Chez la femme sont notés le taux de FSH, l'oestradiolémie et le rapport FSH/LH à J3. Concernant la stimulation de l'ovulation, l'étude prend en compte le protocole de stimulation et le type de gonadotrophines, la dose totale de gonadotrophines, la durée de stimulation, l'oestradiolémie le jour du déclenchement.

Les paramètres de la ponction et la micro-injection pris en compte sont : le nombre total d'ovocytes ponctionnés, la maturité et la qualité des ovocytes ponctionnés, leur stade de maturité: vésicule germinative, en métaphase I, métaphase II, le nombre total d'ovocytes micro-injectés et leur morphologie, le délai entre la ponction et la micro-injection.

Concernant l'appréciation de la morphologie des ovocytes, les techniciennes effectuant la micro-injection ont apprécié visuellement au microscope le cytoplasme ovocytaire, l'épaisseur ou l'irrégularité de la zone pellucide, l'aspect du 1^{er} globule polaire ou de l'espace périvitellin et ont, pour chacun de ces paramètres, décrit s'il était normal ou pas, pour chaque ovocyte micro-injecté. (Annexe III)

Concernant l'homme, sont pris en compte l'âge, le spermogramme avec la numération, la mobilité, leur morphologie (prédominance d'anomalies de l'acrosome, de microcéphales ou d'autres anomalies), leur vitalité, la présence d'auto-Anticorps, l'état du sperme: frais ou congelé, le mode de recueil: éjaculat; extraction épидидymaire; déférentielle; testiculaire. En cas d'azoospermie est notée l'étiologie obstructive, non obstructive ou mixte.

Concernant l'appréciation des embryons (Annexe II) :

Entre 16 et 18 heures post-fécondation, les zygotes sont observés et sont notés la dégénérescence ovocytaire, ovocytes bruns, ovocytes à 1 pronucléus, zygotes à 2 ou 3 pronucléi.

Au 2ème ou 3ème jour après la ponction, sous la hotte à flux en marche, les embryons sont observés avant le transfert in-utéro :

Sont notés le nombre et la qualité des embryons obtenus au microscope objectif 20 filtre MC2 à 37°C sur platine chauffante.

La qualité des embryons est appréciée grâce à cette classification:

- Nombre de blastomères par embryon à J2 et/ou J3
- Régularité des blastomères et pourcentage de fragmentation de chaque embryon. (Annexe I)

Embryon de type I : Blastomères réguliers pas de fragmentation.

Embryon de type II : Blastomères irréguliers et pas de fragmentation.

Embryon de type III : Blastomères irréguliers et moins de 50% de fragmentation.

Embryon de type IV : Blastomères irréguliers et plus de 50% de fragmentation.

Les embryons sont photographiés au grossissement 20, les images sont enregistrées dans l'ordinateur de stockage des images.

2.5. Les méthodes statistiques

L'analyse des données recueillies a été réalisée avec le logiciel Epidata®. En analyse bivariée, les variables quantitatives ont été exprimées par leurs moyennes, écart-types et les variables qualitatives, en pourcentage de la totalité de l'échantillon, des cas et des témoins.

Pour la comparaison des variables qualitatives, nous avons utilisé le test du Khi 2 d'indépendance ou le test de Fisher exact selon les possibilités d'application. Pour les variables quantitatives, a été utilisé le test de Student.

Pour tester la corrélation entre plusieurs variables ou des variables qualitatives en classe, les procédures ANOVA ont été utilisées.

Pour tous ces tests, le seuil de significativité a été fixé tel que $p < 0.05$.

3. Résultats

Les différents paramètres clinico-biologiques des groupes étudiés sont décrits et dans une analyse bivariée, comparés entre cas et témoins afin de mettre en évidence les paramètres significativement corrélés aux échecs d'ICSI chez les cas.

3.1. Analyse bivariée de la population étudiée

Au total, 107 couples ont été étudiés entre janvier 2004 et décembre 2008, au cours de 71 tentatives d'ICSI permettant un remplacement embryonnaire (groupe des témoins) et 36 tentatives d'ICSI ne permettant pas ce remplacement (groupe des cas). Sur ces 36 tentatives, 24 n'ont obtenu aucun embryon et 12 ont obtenu des embryons de qualité insuffisante.

3.1.1. Population étudiée

3.1.1.1. Les couples

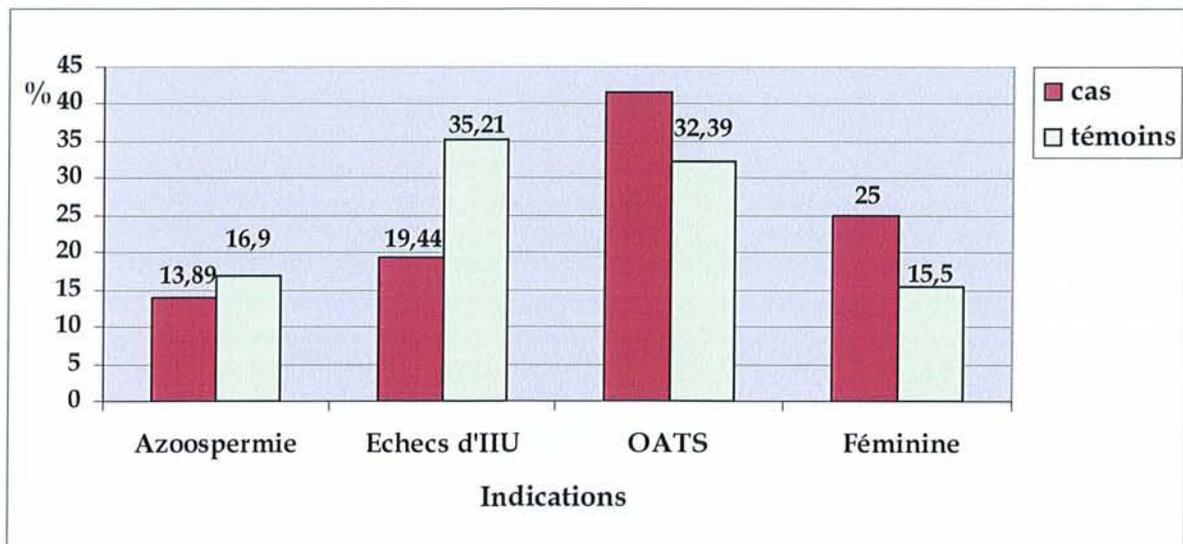
3.1.1.1.1. Le type d'infertilité

L'infertilité est primaire pour 80.6% des couples cas et de 73.2% des couples témoins, sans différence significative mise en évidence.

		Type d'infertilité		Total
		primaire	secondaire	
Cas	Effectif	29	7	36
	% total	27.10	6.54	33.64
	% de cas	80.56	19.44	
Témoins	Effectif	52	18	71
	% total	48.60	17,75	66.36
	% de témoins	73.24	26,76	
Total	Effectif	81	25	107
	% total	75.70	23.36	100.00

Tableau n°3 : Type d'infertilité du couple, description dans la population étudiée

3.1.1.1.2. L'indication de l'ICSI



OATS : Oligoasthénospermie

Figure 19 : Répartition des indications de l'ICSI entre cas et témoins

L'indication recensée est l'indication principale retenue de la FIV ICSI. L'indication féminine regroupe l'étiologie tubaire 7cas et 8 témoins, une insuffisance ovarienne prématurée parmi les cas, un cas d'endométriose dans chaque groupe cas et témoin, une anovulation parmi les cas. Sur le graphe, les indications sont rapportées en % du groupe étudié et non en effectif, du fait du choix d'un effectif témoin double des cas.

		Groupes d'étude		
		Cas	Témoins	Total
Azoospermie	N*	5	12	17
	%	13.89	16.90	15.89
Echecs d'IIU	N*	7	25	32
	%	19.44	35.21	29.91
OATS	N*	15	23	38
	%	41.67	32.39	35.51
Indication féminine	N*	9	11	20
	%	25	15.1	18.69

Tableau n°4 : Comparaison des indications entre les cas et témoins (Test de Fisher ; $p < 0.05$) *N= effectif

La répartition des étiologies de l'ICSI est significativement différente entre cas et témoins. Les indications féminines et OATS sont proportionnellement significativement plus nombreuses dans le groupe des cas et par conséquent, le groupe des témoins comprend plus d'indications d'ICSI pour azoospermie et échecs d'IIU. En cas d'échecs d'IIU préalables à l'ICSI, il n'y a pas de différence significative entre les cas et témoins concernant le nombre d'IIU.

	Effectif	Nombre d'échecs d'IIU préalables			
		Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum
Population totale	104	1,84	2,23	0	8
Cas (1)	34	1.32	2.20	0	8
Témoins (2)	70	2.086	2.21	0	7
Différence(1-2)		-0.762	2.21		

Tableau n°5 : Comparaison du nombre d'échecs préalables d'IIU entre les cas et témoins (Test de Student $p=0.1$)

3.1.1.1.3. La durée d'infertilité du couple

	Effectif	Durée d'infertilité du couple (en années)			
		Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum
Population totale	105	5,28	2,95	0,5	16
Cas (1)	36	5.0194	2.0809	1	13
Témoins (2)	69	5.4203	2.6962	0.5	16
Différence(1-2)		-0.401	2.6076		

Tableau n°6 : Comparaison des durées d'infertilité entre les cas et témoins (Test de Student $p=0.5$)

Il n'existe pas de différence significative entre les cas et témoins concernant la durée d'infertilité du couple.

3.1.1.1.4. Le rang de la tentative

La répartition des rangs de tentative n'est pas différente chez les cas et témoins ($p=0.2$).

	Effectif	Rang de la tentative d'ICSI			
		Moyenne	Quartile inférieur	Médiane	Quartile supérieur
Cas	36	2	1.00	2.00	3.00
Témoins	71	2.2817	1.00	2.00	3.00

Tableau n°7 : Comparaison du rang de tentative entre les cas et témoins (Test de Student $p=0.2$)

3.1.1.2. Les femmes

➤ L'âge

Les groupes cas et témoins ont été appariés par ce critère. A chaque cas sont appariés deux témoins de la tranche d'âge, à un an près ; sauf pour un cas, car la tranche d'âge de 42 ans n'a pu produire qu'un témoin correspondant au cas.

L'âge minimal est de 22 ans et l'âge maximal est de 42 ans pour une moyenne de 33.8 ans. Sont donc retenus 71 témoins pour 36 cas.

➤ L'Indice de Masse Corporelle (IMC)

	Effectif	IMC féminin			
		Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum
Population totale	103	22.65	4.079	18	36
Cas (1)	35	22.971	3.996	18	33
Témoins (2)	68	22.485	4.141	18	36
Différence (1-2)		0.4861	4.093		

Tableau n°8 : L'IMC chez la femme, description dans la population étudiée.

La moyenne des IMC chez les cas est de 23 kg/m² et celle des témoins de 22.5 kg/m², sans différence significative entre les deux groupes.

Les patientes présentant une obésité, ayant un IMC supérieur ou égal à 30kg/m² sont au nombre de 9. Les patientes ayant un IMC inférieur à 30 kg/m², sont au nombre de 94.

		IMC<30 kg/m ²	IMC≥30 kg/m ²	Total
Cas	Effectif	31	4	35
	% total	30.10	3.88	33.98
	% de cas	88.57	11.43	
Témoins	Effectif	63	5	68
	% total	61.17	4.85	66.36
	% de témoins	92.65	7.35	
Total	Effectif	94	9	103
	% total	91.26	8.74	100

Tableau n°9 : Description dans la population étudiée de la répartition des patientes obèses et non obèses.

Selon le test de Fisher, la différence retrouvée dans la répartition des femmes obèses et non obèses entre cas et témoins n'est pas significative ($p=0.21$).

➤ La consommation de tabac chez la femme

Les femmes ont été considérées comme fumeuses dès lors qu'elles fument une cigarette par jour. Des résultats comparables ont été obtenus lorsque le tabagisme est considéré positif à partir de cinq cigarettes par jour.

Le pourcentage de fumeuses est de 25% parmi les cas et de 16.9% parmi les témoins, sans différence significative entre les deux groupes.

Cependant, les cas fument plus de cigarettes que les témoins, de façon significative ($p=0.04$).

La moyenne de cigarettes consommées chez les cas est de 3 cigarettes/jour et de 1 cigarette/jour chez les témoins.

Si les fumeuses ne sont pas significativement plus nombreuses chez les cas, elles fument plus.

Un effet-dose n'a pu être retrouvé par un test de régression linéaire.

	Effectif	Consommation de tabac en Cigarettes / j			
		Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum
Population totale	107	1.73	4.38	0	20
Cas (1)	36	2.92	5.90	0	20
Témoins (2)	71	1.13	3.25	0	20
Différence(1-2)		1.79	4.32		

Tableau n°10 : Consommation de tabac chez la femme, description dans la population étudiée (Test de Student p=0.04)

5.6% des cas reconnaissent être exposées à un tabagisme passif ce qui est statistiquement supérieur aux témoins (0%) (p=0.045). Ceci est pourtant difficilement interprétable du fait de l'insuffisance des données et de la difficulté d'interroger les couples à ce sujet.

➤ Le caryotype

Tous les caryotypes ont été renseignés. Sur l'ensemble des femmes, 97.19% (104/107) ont des caryotypes 46, XX ; 0.94% (1/107) ayant une variante de la normale : 46, XX 9h+ et 0.94% (1/107) porteuse sur 2 mitoses de 3 chromosomes X : 46, XX/ 47 XXX, ainsi que 0.94% (1/107) porteuse d'une mosaïque 46, XX/47, XXX.

➤ Les antécédents de fausses-couches

13.89% des cas ont subi au moins une fausse-couche avant cette tentative contre 12.68% des témoins sans différence significative mise en évidence (p=0.8%).

➤ L'endométriose

Une endométriose, tous stades confondus, est retrouvée chez 9.35% de la population étudiée et est présente chez 11.1% des cas et 8.45% des témoins, sans différence significative entre les 2 groupes.

		Non endométriosiques	Endométriosiques	Total
Cas	Effectif	32	4	36
	% total	29.91	3.74	33.64
	% de cas	88.89	11.11	
Témoins	Effectif	65	6	71
	% total	60.75	5.616	66.36
	% de témoins	91.55	8.45	
Total	Effectif	97	10	107
	% total	90.65	9.35	100

Tableau n°11 : Description dans la population étudiée de la répartition des patientes endométriosiques et non endométriosiques (test de Student $p=0.2$)

➤ La qualité ovulatoire

44.44% des patientes cas sont oligo-anovulatoires contre 54.93% des patientes témoins, sans différence significative (test de Fisher, $p=0.3$).

		Oligoanovulation	Ovulation normale	Total
Cas	Effectif	16	20	36
	% total	14.95	18.69	33.64
	% de cas	44.44	55.56	
Témoins	Effectif	39	32	71
	% total	14.95	18.69	33.64
	% de témoins	54.93	45.07	
Total	Effectif	55	52	107
	% total	51.40	48.60	100.00

Tableau n°12 : Description dans la population étudiée de la répartition des patientes ovulatoires et oligoanovulatoires

Seules 4 insuffisances ovariennes prématurées sont rapportées et appartiennent toutes au groupe des cas.

➤ Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK)

Un SOPK est diagnostiqué chez 14.95% de la population féminine, chez 19.5% des cas et 12.7 % des témoins, mais la différence de répartition n'est pas significative entre les 2 groupes.

		Non SOPK	SOPK	Total
Cas	Effectif	29	7	36
	% total	27.10	6.54	33.64
	% de cas	80.56	19.44	
Témoins	Effectif	62	7	71
	% total	57.94	8.41	66.36
	% de témoins	87.32	12.68	
Total	Effectif	91	16	107
	% total	85.05	14.95	100

Tableau n°13 : Description dans la population étudiée de la répartition des patientes SOPK et non SOPK

3.1.1.3. Les paramètres de la stimulation

3.1.1.3.1. Le bilan hormonal

	Effectif	Taux de FSH à J3			
		Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum
Population totale	106	6,912264	2,41573	2,6	19
Cas	36	7.85	3.01	3.9	19
Témoins	70	6.43	1.89	2.6	11.7

Tableau n°14 : Taux de FSH à J3, description dans la population étudiée

Le taux de FSH à J3 est en moyenne de 7.85 mUI/mL chez les cas et de 6.43mUI/mL, supérieur chez les cas par rapport aux témoins de façon très significative (p=0.0037).

Le taux d'E2 à J3 est en moyenne de 47 pg/mL chez les cas et 50 pg/mL chez les témoins sans différence significative mise en évidence entre les 2 groupes.

	Effectif	Taux d'E2 à J3			
		Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum
Population totale	95	49.15789	28.57179	10.00	173.00
Cas	34	47.353	29.933	16	173
Témoins	61	50.164	27.987	10	138

Tableau n°15 : Taux d'E2 à J3 , description dans la population étudiée

En revanche, le taux d'œstradiol lors du déclenchement est significativement supérieur chez les témoins : 2330 pg/mL par rapport aux cas : 1633.8 pg/mL (p=0.005). Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence un taux d'oestradiol-seuil pour le déclenchement.

	Effectif	Taux d'E2 lors du déclenchement			
		Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum
Population totale	106	2100,1	1215,9	5676	106
Cas	35	1633.8	1208.7	255	4434
Témoins	71	2330	1160	320	5676

Tableau n°16 : Taux d'E2 lors du déclenchement, description dans la population étudiée

3.1.1.3.2. Les protocoles de stimulation

➤ Les agonistes et antagonistes de la GnRH :

81 stimulations ont été faites sous protocole agoniste long ou court à dose quotidienne sans protocole retard et 26 stimulations sous protocole antagoniste à dose quotidienne sans dose retard.

Concernant les stimulations des cas, la répartition est de 83.33% d'agonistes contre 16.67% d'antagonistes, sans différence significative avec les stimulations des témoins avec 71.83% d'agonistes et 28.17% d'antagonistes.

		Agoniste	Antagoniste	Total
Cas	N	30	6	36
	% total	28,04	5,61	33,64
	% des cas	83,33	16,67	
Témoins	N	51	20	71
	% total	47,66	18,69	66,36
	% des témoins	71,83	28,17	
Total	N	81	26	107
	% total	75,7	24,29	100.0

Tableau n°17 : Répartition des protocoles agonistes et antagonistes dans les groupes cas et témoins

➤ Les gonadotrophines utilisées

		Gonadotrophines			Total
		FSH recombinante	FSH urinaire	hMG urinaire	
Cas	N	30	2	4	36
	% total	28.04	1.87	3.74	33.64
	% des cas	83.33	5.56	11.11	
Témoins	N	56	6	9	71
	% total	52.34	5.61	8.41	66.36
	% des témoins	78.87	8.45	12.68	
Total	N	86	8	13	107
	% total	80.37	7.48	12.15	100.0

Tableau n°18 : Répartition des gonadotrophines dans les groupes cas et témoins

L'étude ne retrouve pas de différence entre le groupe des cas et des témoins concernant la répartition des gonadotrophines utilisées.

La répartition de l'utilisation des gonadotrophines est en faveur de la FSH recombinante pour l'ensemble de la population étudiée ; l'utilisation de FSH urinaire et d'hMG urinaire est 4 à 5 fois moins fréquente que la FSH recombinante.

➤ La dose totale de gonadotrophines

	Effectif	Dose totale de gonadotrophines			
		Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum
Population totale	107	2699,206	1328,892	775	9300
Cas (1)	36	3397.3	1674.6	787	9300
Témoins (2)	71	2345.3	945.72	775	4650
Différence(1-2)		1052	1237.3		

Tableau n°19 : Dose totale de gonadotrophine, description dans la population étudiée

La moyenne des doses totales de gonadotrophines utilisées des cas, de 3397.4 UI, est significativement supérieure à celle des témoins de 2345.4 UI ($p < 0.001$). Une dose totale de gonadotrophines - seuil n'a pu être mise en évidence.

➤ La durée de la stimulation

La durée moyenne de stimulation de la population globale est de 10.6 jours. L'étude ne retrouve pas de différence significative entre la moyenne de durée de stimulation des cas de 10.8 jours et celle des témoins de 10.6 jours.

	Effectif	Durée moyenne de stimulation (en jours)			
		Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum
Population totale	107	10,64486	1,561641	7	17
Cas (1)	36	10,81	1,67	8	17
Témoins (2)	71	10,56	1,51	7	16
Différence(1-2)		0.24	1.56		

Tableau n°20 : Durée de stimulation ovarienne, description dans la population étudiée

3.1.1.4. L'appréciation du recueil ovocytaire

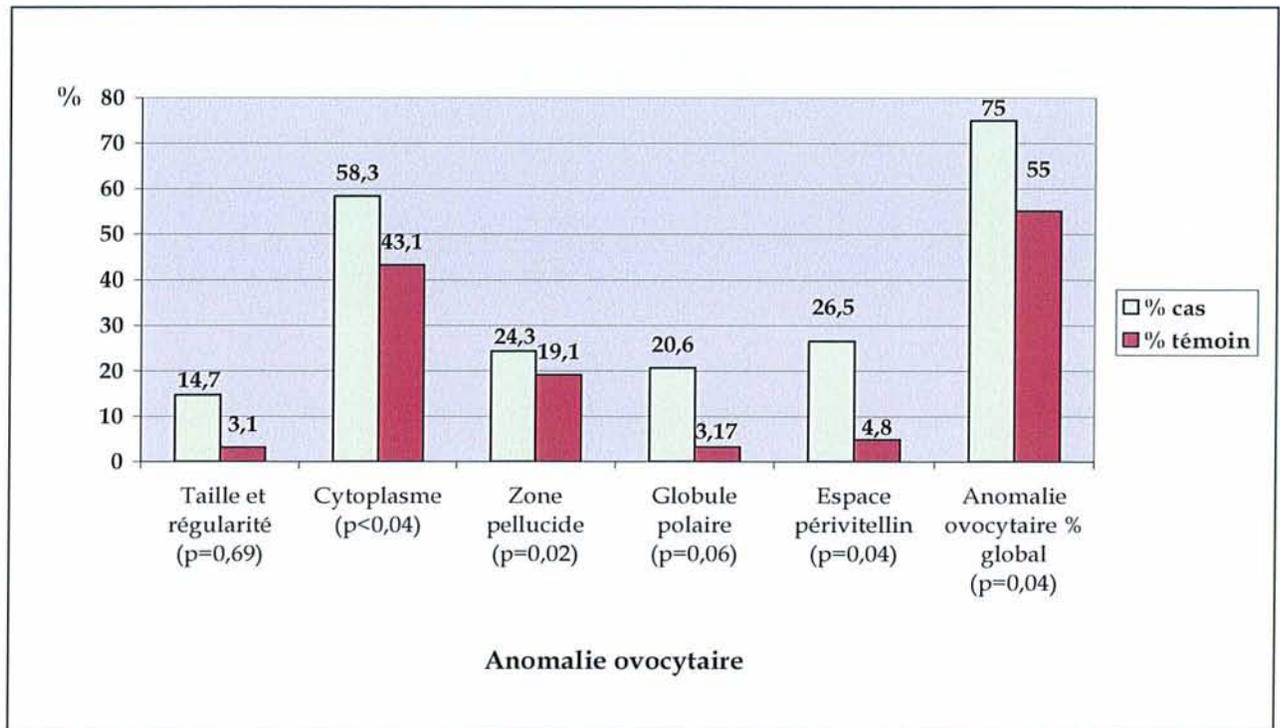


Figure n° 20 : Répartition des anomalies ovocytaires entre les cas et les témoins

3.1.1.4.1. *L'appréciation de la régularité et de la taille des ovocytes*

La régularité et la taille des ovocytes ont été appréciées par le technicien qui effectue la micro-injection ovocytaire. Une anomalie de ces paramètres a été retrouvée chez 14.7% des ovocytes des cas et 3.1% des ovocytes des témoins. La différence retrouvée n'est pas significative selon le test de Fisher ($p=0.69$).

3.1.1.4.2. L'appréciation visuelle du cytoplasme ovocytaire

Des anomalies du cytoplasme ovocytaire, telles que l'aspect granuleux diffus, les zones granuleuses ou l'aspect brun des ovocytes, ont été observées pour 58.33% des cas et 43.08% des témoins. La différence retrouvée est significative selon le test de Fisher ($p < 0.04$).

3.1.1.4.3. L'épaisseur ou irrégularité de la zone pellucide

Les anomalies de l'épaisseur ou les irrégularités de la zone pellucide sont constatées chez 14.29% des cas et 19.05% des témoins. La différence retrouvée est significative selon le test de Fisher ($p = 0.02$).

3.1.1.4.4. L'appréciation du 1^{er} globule polaire

Les anomalies du 1^{er} globule polaire sont constatées à 20.6% chez les cas et 3.17% chez les témoins. La différence est significative selon le test de Fisher ($p = 0.06$).

3.1.1.4.5. L'appréciation de l'espace périvitellin

Une anomalie de l'espace périvitellin est constatée pour 26.5% des cas et pour 4.76% des témoins. La différence est significative selon le test de Fisher ($p = 0.04$).

3.1.1.4.6. Le pourcentage global d'anomalie ovocytaire

Une variable a été créée, regroupant toutes les anomalies ovocytaires en un pourcentage global pour les comparer chez les cas et témoins.

Les anomalies morphologiques ovocytaires sont significativement plus fréquentes chez les ovocytes cas (75% des cas) par rapport aux témoins (55% des témoins; $p = 0.04$ selon le test de Fisher).

3.1.1.4.7. Nombre d'ovocytes par ponction

- Le nombre moyen par ponction de **complexes cumulo-ovocytaires recueillis** est significativement supérieur chez les témoins par rapport aux cas.

- Le nombre moyen **d'ovocytes en métaphase II** par ponction, conditionnant le nombre d'ovocytes micro-injectés, est en moyenne, très significativement supérieur chez les témoins ($N = 8.1$) par rapport aux cas ($N = 2.4$) ($p < 0.0001$). Le nombre d'ovocytes micro-injectés est, en conséquence, significativement supérieur chez les témoins (moyenne de 8.1), par rapport aux cas (moyenne de 2.4 ; $p < 0.0001$).

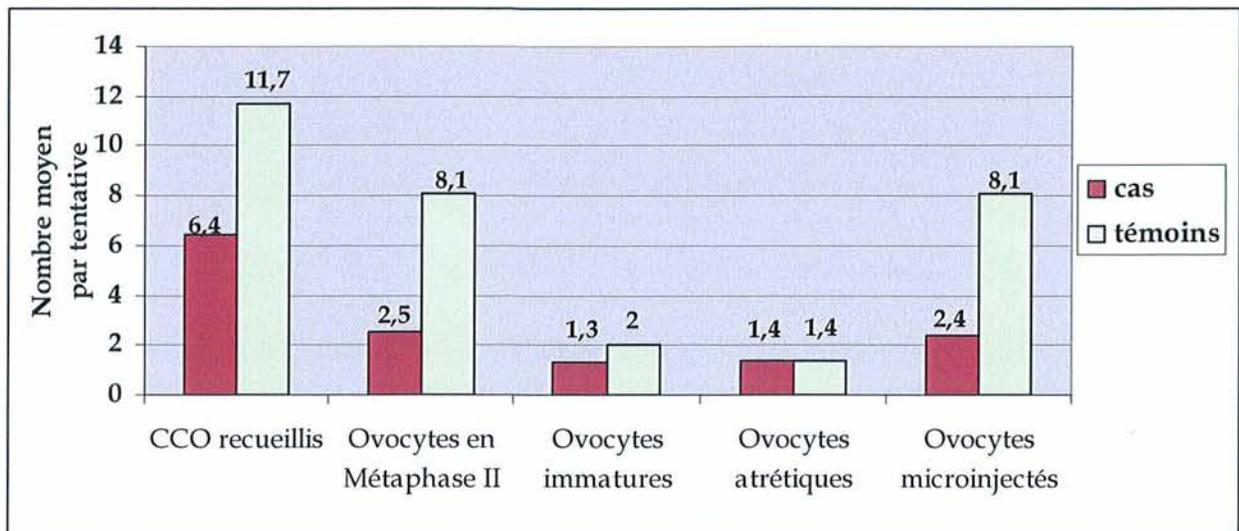


Figure n°21 : Comparaison du nombre moyen par tentative de CCO ponctionnés, d'ovocytes en métaphase II, d'ovocytes en métaphase I ou vésicules germinatives, d'ovocytes atrétiques et d'ovocytes micro-injectés chez les cas et témoins (Test de Student)

- Le nombre d'ovocytes en métaphase I ou présentant une vésicule germinale par ponction, c'est-à-dire, immatures est en moyenne de 1.3 pour les cas et de 2 pour les témoins, sans différence significative mise en évidence entre les 2 groupes.
- Le nombre d'ovocytes atrétiques est, en moyenne par ponction, chez les cas de 1.44 et chez les témoins de 1.42, sans différence significative mise en évidence entre les 2 groupes.
- Le ratio du nombre d'ovocytes en métaphase II sur le nombre de CCO recueillis est significativement supérieur chez les témoins par rapport aux cas (Test de Student ; $p < 0.0001$)

	Effectif	Nombre d'ovocytes en métaphase II / Nombre de CCO recueillis			
		Ratio	Écart-type	Minimum	Maximum
Population totale	106	0.65	0.25	0.06	1
Cas (1)	35	0.48	0.28	0.06	1
Témoins (2)	71	0.73	0.20	0.14	1
Différence(1-2)		-0.24	0.23		

Tableau n°21 : Ratio du nombre d'ovocytes en métaphase II sur le nombre de CCO recueillis, description dans la population étudiée.

3.1.1.4.8. Le délai entre la ponction et la micro-injection

Avant 2007, cette donnée n'était pas prise en compte dans les comptes-rendus de tentatives d'ICSI, elle n'a donc été renseignée que pour 15 cas et 48 témoins. Ce délai est en moyenne de 93 min chez les cas et de 126 min chez les témoins, mais aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

	Effectif	Délai entre la ponction et la microinjection			
		Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum
Population totale	63	138,16	44	63	280
Cas (1)	15	120.33	49.41	50	210
Témoins (2)	48	143.73	61.91	44	280
Différence(1-2)		-23.4	59.27		

Tableau n°21 : Délai entre la ponction et la micro-injection, description dans la population étudiée

3.1.1.5. Les hommes

3.1.1.5.1. L'âge et l'IMC

- L'âge moyen des cas masculins est de 36.3 ans contre 37.3 ans chez les témoins. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les 2 groupes.

	Effectif	Age de l'homme			
		Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum
Population totale	107	36.985	6.20	26	57
Cas (1)	36	36.328	5.0304	28	49
Témoins (2)	71	37.318	6.7249	26	57
Différence(1-2)		-0.991	6.2116		

Tableau n°23 : Age de l'homme, description dans la population étudiée

- L'Indice de Masse Corporelle de l'homme fait partie des critères du questionnaire de l'étude mais il est insuffisamment renseigné dans les dossiers cliniques pour permettre une exploitation statistique.

3.1.1.5.2. La consommation de tabac

Le pourcentage de fumeurs est de 47.2% parmi les cas et de 40.85% parmi les témoins. La moyenne de cigarettes consommées chez les cas est de 6.7 cigarettes par jour et de 5.2 cigarettes par jour chez les témoins. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les 2 groupes.

	Effectif	Tabagisme de l'homme (Cigarette / j)			
		Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum
Population totale	107	5.73	7.88	0	30
Cas (1)	36	6,7	8,27	0	30
Témoins (2)	71	5,2	7,68	0	25
Différence(1-2)		1,5	0.61		

Tableau n°24 : Consommation de tabac chez l'homme, description dans la population étudiée

3.1.1.5.3. Exposition à des toxiques

Les expositions professionnelles à des solvants, pesticides, peintures ou consommation de drogues, cannabis ont été recherchées dans les dossiers cliniques et mises en commun. Cette exposition concerne 19.44% des cas et 14.08% des témoins, sans différence significative mise en évidence entre les 2 groupes.

3.1.1.5.4. Paternité antérieure

L'étude n'a pas mis en évidence de différence entre le groupe des témoins et des cas (0.1enfant/cas contre 0.24 enfant/témoin).

3.1.1.5.5. Le caryotype

101 caryotypes sont normaux. Chez les cas, sont retrouvés les caryotypes suivants : un 47, XYY, une variante de la normale 47, XY avec un satellite 8. Chez les témoins sont retrouvés une micro-délétion du chromosome Y AZF c, une mutation du gène CFTR, une mosaïque 46, XY ; 47, XXY. La répartition entre les deux n'est pas significative.

3.1.1.5.6. L'origine du sperme

		Origine du sperme			Total
		Ejaculat	Testiculaire	Urinaire	
Cas	N	30	5	1	36
	% total	28.04	4.67	0.93	33.64
	% des cas	83.33	13.89	2.78	
Témoins	N	62	9	0	71
	% total	57.94	8.41	0	66.36
	% des témoins	87.32	12.68	0	
Total	N	92	14	1	107
	% total	85.98	13.08	0.93	100.0

Tableau n°25 : Origine du sperme, description dans la population étudiée

Pour l'origine du sperme, aucune différence significative n'est retrouvée entre cas et témoins.

3.1.1.5.7. L'état du sperme

Le sperme a été utilisé à l'état frais pour 83 tentatives, à répartition égale entre cas et témoins (77.6% +/- 0.2%) et à l'état congelé pour 24 tentatives, à répartition égale entre cas et témoins (22.4 % +/- 0.2%).

3.1.1.5.8. Les paramètres spermiologiques

- La numération spermatique du recueil

➤ Un seul cas de présence d'auto-anticorps a été retrouvé. La présence d'auto-anticorps anti-spermatozoïdes est trop peu renseignée chez les cas et les témoins pour permettre une exploitation statistique.

3.1.1.6. L'appréciation des embryons

Parmi les 36 tentatives ne permettant pas de remplacement embryonnaire, 12 tentatives ont permis l'obtention d'embryons de qualité insuffisante. Ces embryons-cas ont été comparés aux embryons de la population témoin.

	Groupes d'étude		Test de Student Significativité :p
	Cas	Témoins	
zygotes à 2 pronucléi *	0,73	5,4	<0,0001
vésicules germinatives ou zygote à un pronucléus *	1,08	1,32	0,45
zygotes à 3 pronucléi *	0,36	0,24	0,46
embryons de 2 à 3 cellules à J2*	0,55	1,56	0,001
embryons de 4 à 5 cellules à J2*	0,45	3,45	<0,0001
embryons de 6 à 7 cellules à J2*	0,09	0,62	0,003
embryons de 8 cellules et plus*	0	0,18	0,01
blastomères à J2*	2,73	4,02	0,04

* nombre moyen par tentative

Tableau n°25 : Comparaison de critères quantitatifs et qualitatifs embryonnaires des cas et témoins (Test de Student)

Le nombre de zygotes à 2 pronucléi par tentative d'ICSI est significativement plus élevé chez les témoins ($p < 0.0001$), il est en moyenne de 0.34 chez les cas et 5.4 chez les témoins. La différence concernant le nombre d'embryons de 4 à 5 cellules à J2, entre cas et témoins, est très significative ($p < 0.0001$).

Aucune différence significative n'a été mise en évidence, concernant le nombre de vésicules germinatives, zygotes à 1 pronucléus et 3 pronucléi obtenus par tentative, chez les cas et les témoins.

	Cas	Témoins	Test de Student : p
Taux de fragmentation embryonnaire (%)	21,25	9,43	0,006

Tableau n° 26: Comparaison du taux de fragmentation embryonnaire des cas et témoins (Test de Student)

Le taux de fragmentation embryonnaire est significativement supérieur chez les cas par rapport aux témoins.

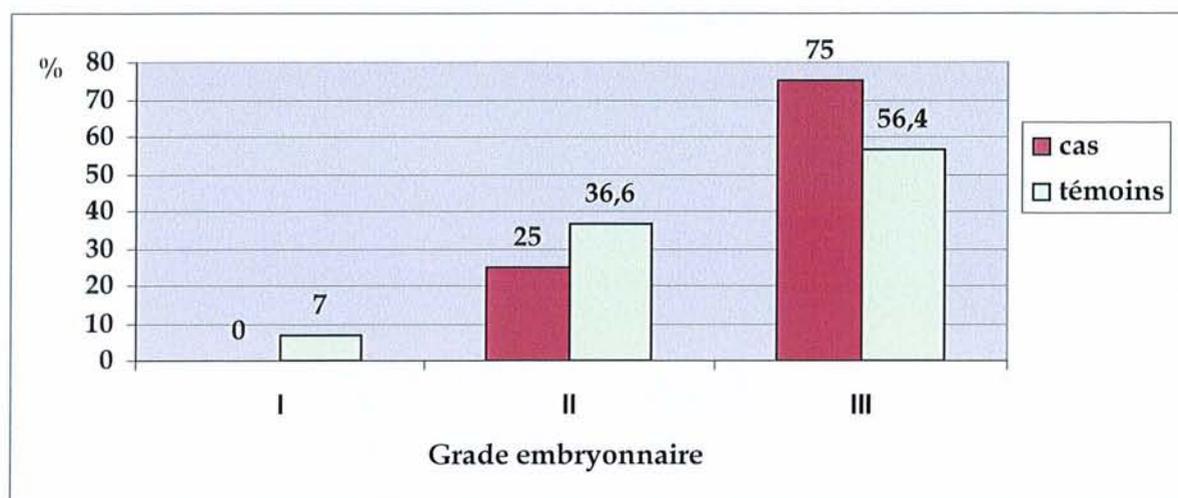


Figure n°22 : Répartition des grades embryonnaires entre cas et témoins

La différence entre la répartition des grades des cas et témoins n'est pas significative selon le test de Fisher ($p < 0.14$).

3.2. Analyse multivariée

L'analyse multivariée des paramètres pris en compte dans cette étude ne permet pas de mettre en évidence la prédominance d'un paramètre sur un autre en dehors du nombre d'embryon obtenu. (Par définition, les cas ont pas ou moins d'embryons que les témoins.)

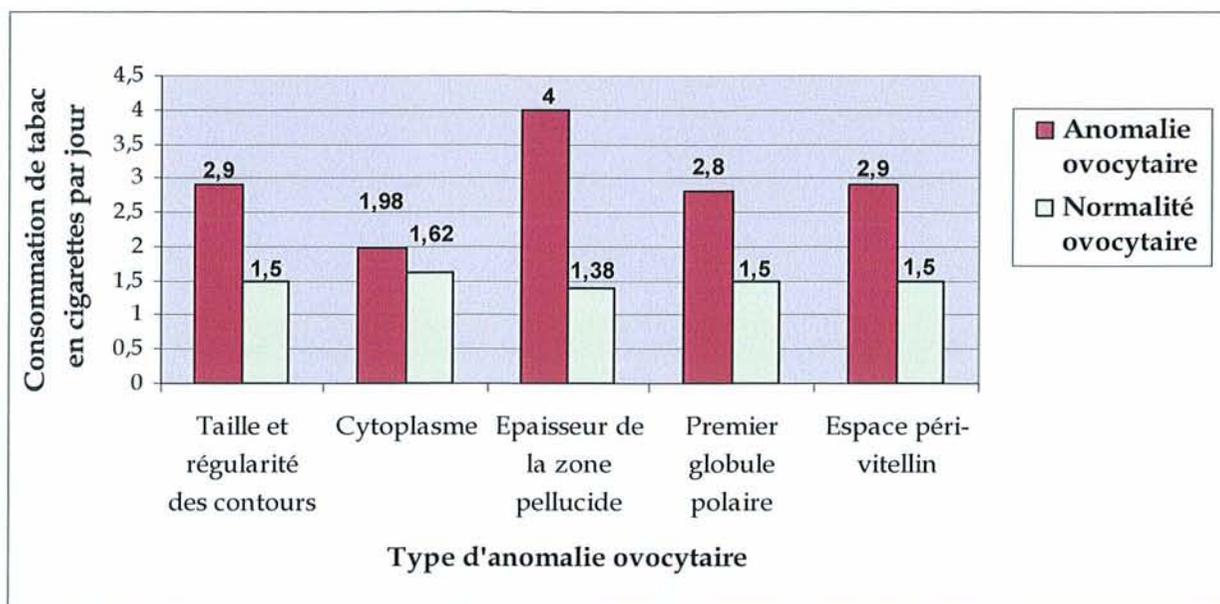


Figure 23 : Consommation de tabac (en cigarettes / jour) dans les populations avec et sans anomalies ovocytaires

	Tabagisme de la femme	
	Coefficients de corrélation de Pearson : r	Significativité du test : p
Nombre moyen d'ovocytes ponctionnés	-0.12967	0.1831
Nombre d'ovocytes en métaphase II	-0.17264	0.0768
Nombre d'embryons obtenus	-0.14946	0.1244
Nombre de blastomères à J2	-0.08328	0.4149
Taux de fragmentation embryonnaire (%)	0.10930	0.3376

Tableau n° 27 : Test de corrélation entre le tabagisme féminin, le recueil ovocytaire, le nombre d'ovocytes obtenus en métaphase II, le nombre d'embryons obtenus, le nombre de blastomères par embryon et la fragmentation embryonnaires (Test du Khi deux).

Il existe une faible corrélation négative non significative entre le tabagisme féminin et le nombre d'ovocytes ponctionnés, le nombre d'ovocytes en métaphase II, et le nombre d'embryons. Notre étude n'établit pas de lien entre le tabagisme et le nombre de blastomères à J2, et le taux de fragmentation embryonnaire.

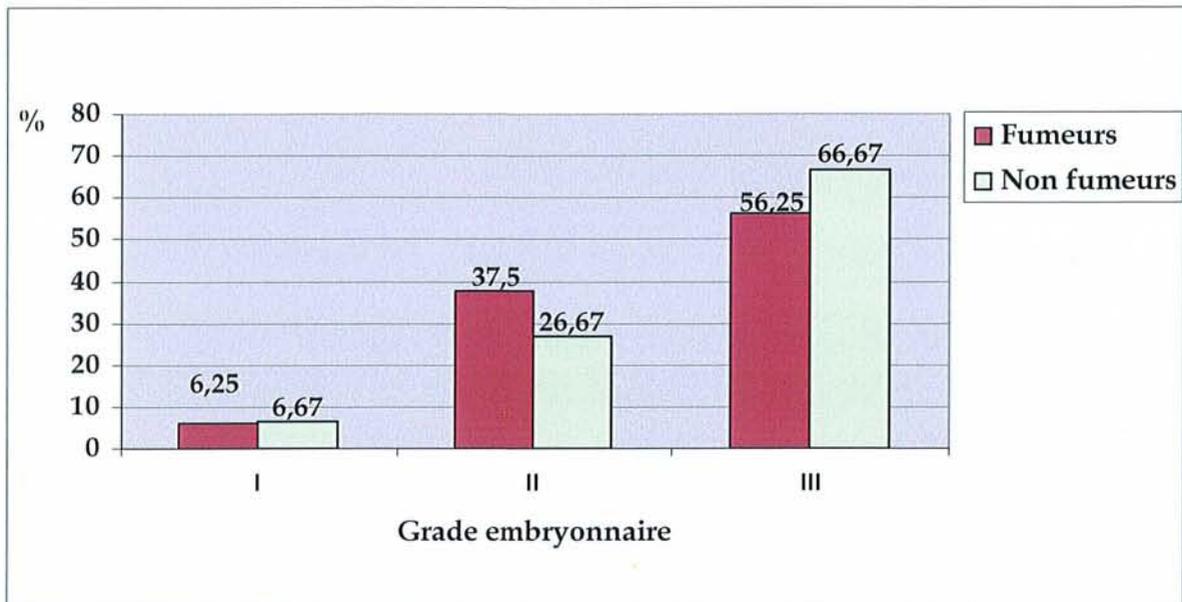


Figure 24 : Comparaison des grades embryonnaires chez les femmes dans les groupes fumeurs et non fumeurs. Test de Fisher ($p=0.08$)

Le grade embryonnaire est plus faible, presque significativement, chez les femmes tabagiques ($p=0.0768$)

3.3.1.3. SOPK

Concernant la qualité ovocytaire, malgré des taux d'anomalies à tendance supérieure dans la population présentant un SOPK, la présence d'un SOPK n'est significativement corrélée qu'aux anomalies du cytoplasme.

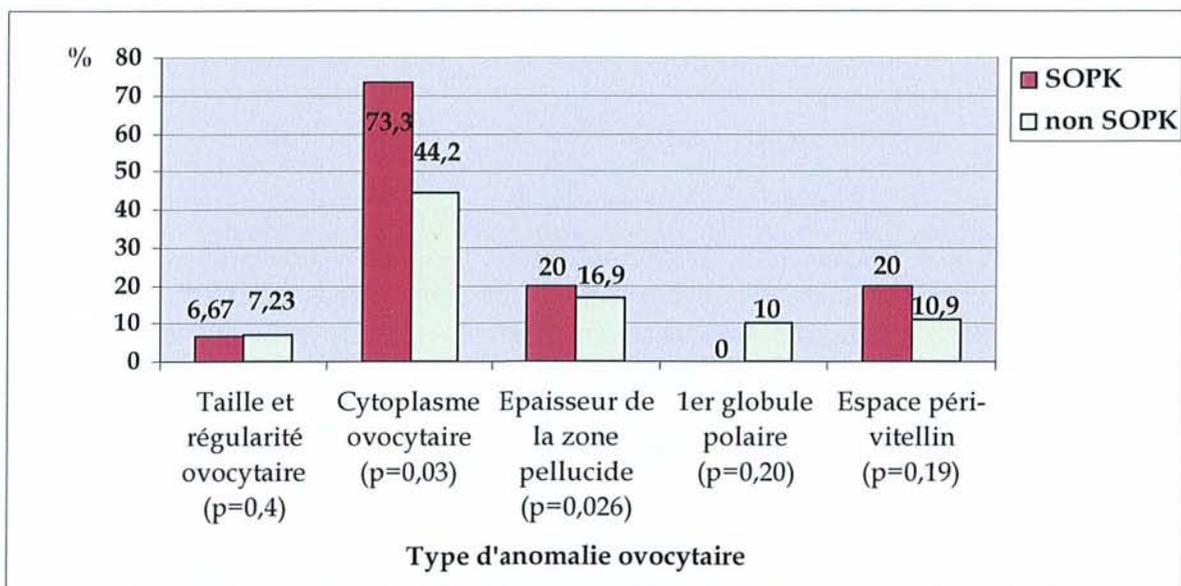


Figure 25 : Répartition des anomalies ovocytaires dans les groupes SOPK et non SOPK (Test de Fisher)

Seul le nombre moyen d'ovocytes ponctionnés est significativement plus élevé en cas de SOPK ($p=0.04$). Le grade embryonnaire semble corrélé à la présence d'un SOPK de façon non significative.

	SOPK	Non SOPK	Test de Student : p
CCO recueillis (n)	12,8	9,4	0,04
Ovocytes en métaphase II (n)	7,3	6,1	0,32
Embryons obtenus (n)	4,9	3,9	0,31
Blastomères par embryon à J2 (n)	2,8	3,2	0,47
Taux de fragmentation (%)	10	10	0,56

(n) : nombre moyen par tentative

Tableau n°28 : Comparaison dans les groupes de femmes porteuses du SOPK et indemnes de SOPK du recueil ovocytaire, du nombre d'ovocytes obtenus en métaphase II, du nombre d'embryons obtenus, du nombre de blastomères par embryon et de la fragmentation embryonnaire (Test de Student)

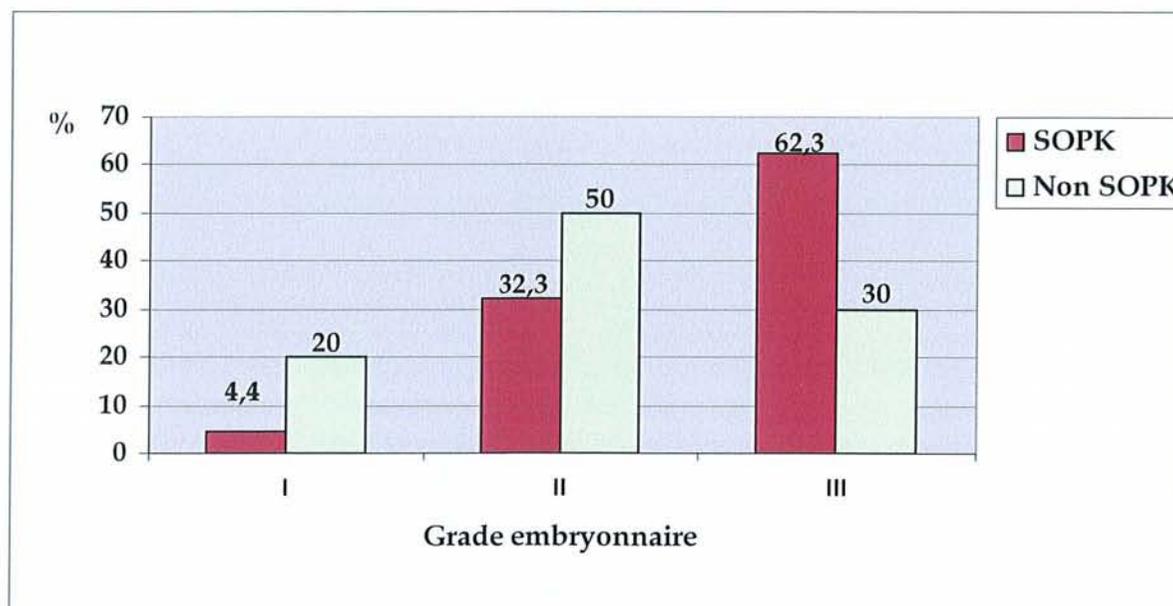


Figure 26 : Comparaison des grades embryonnaires entre SOPK et non SOPK. Test de Student ($p=0.08$)

3.3.1.4. Endométriose

Cette étude ne met pas en évidence de différence significative entre la qualité ovocytaire des patientes avec et sans endométriose (Test de Fisher ; $p > 0.05$).

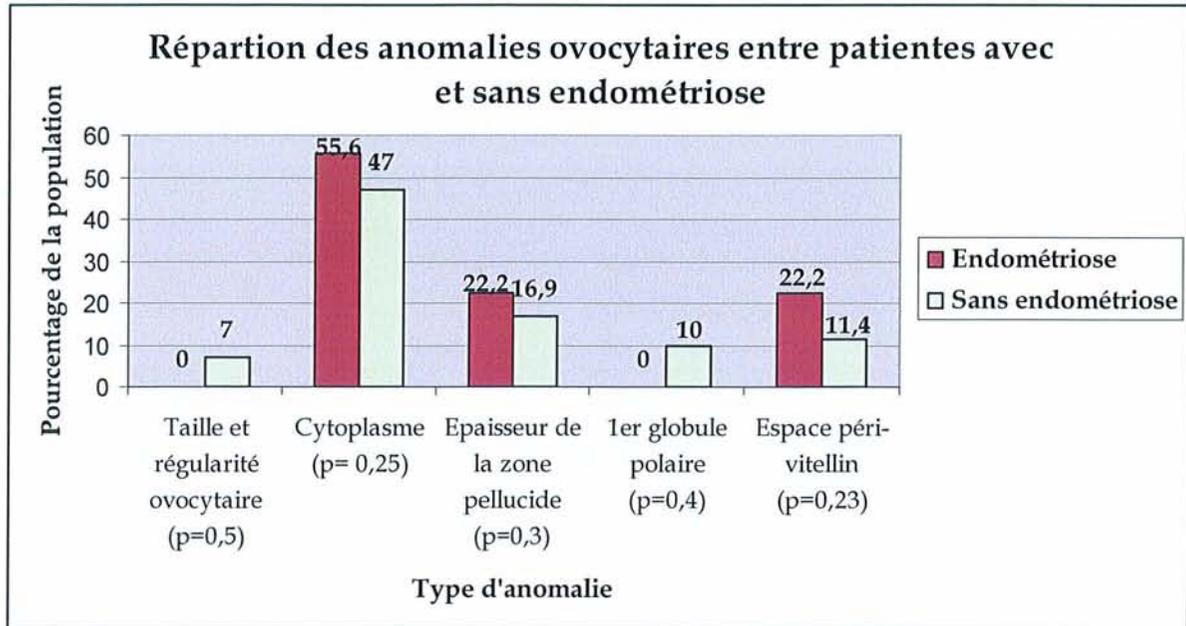


Figure 27 : Répartition des anomalies ovocytaires entre patientes endométriosiques et non endométriosiques (Test de Fisher)

	Endométriose	Pas d'endométriose	Test de Student : p
CCO recueillis (n)	7,2	10,2	0.10
Ovocytes en métaphase II (n)	4,2	6,5	0.10
Embryons (n)	2,7	4,2	0.16
Blastomères par embryon à J2 (n)	3,1	3,1	0.90
Taux de fragmentation embryonnaire(%)	9,3	10,8	0.75

(n) : nombre moyen par tentative

Tableau n°29 : Comparaison dans les groupes de femmes endométriosiques et non endométriosiques du recueil ovocytaire, du nombre d'ovocytes obtenus en métaphase II, du nombre d'embryons obtenus, du nombre de blastomères par embryon et de la fragmentation embryonnaire (Test de Student ; $p > 0.05$)

L'endométriase a tendance à réduire le nombre d'ovocytes ponctionnés, d'ovocytes en métaphase II, le nombre d'embryons mais cette nuance observée n'est pas significative. En revanche, on ne constate aucune différence concernant le nombre de blastomères à J2 et le taux de fragmentation et le grade embryonnaire.

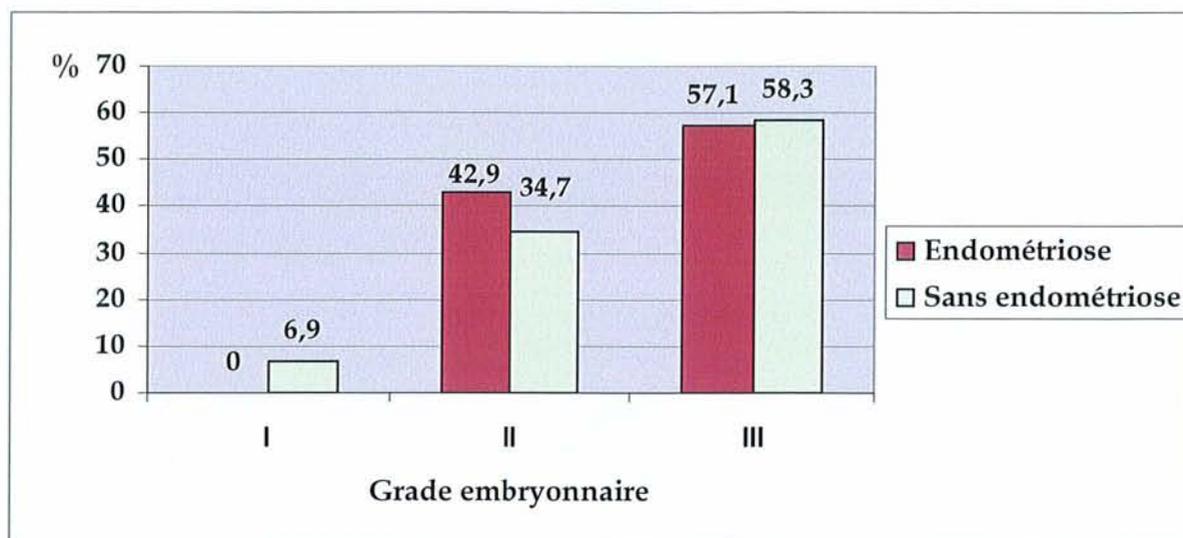


Figure 28: Répartition des grades embryonnaires dans les groupes de patientes endométriosiques et non endométriosiques. Test de Student ($p=0.18$), la différence est non significative.

3.3.2. Paramètres de la stimulation

- On ne retrouve pas de corrélation entre le **taux d'œstradiol à J3** du cycle et la qualité ovocytaire, la réponse à la stimulation, les paramètres embryonnaires.
- En revanche, le **taux d'œstradiol lors de la décision du déclenchement** est significativement corrélé à la réponse à la stimulation par le nombre d'ovocytes ponctionnés et en métaphase II, ainsi qu'au nombre d'embryons obtenus.

	Taux d'œstradiol lors de la décision du déclenchement	
	Coefficients de corrélation de Pearson : r	Significativité du test : p
CCO recueillis	0,47	<0,0001
Ovocytes en métaphase II	0,47	<0,0001
Embryons obtenus	0,5	<0,0001
Blastomères par embryon à J2	0,12	0,24
Fragmentation embryonnaire	0	0.3376

Tableau n°30 : Test de corrélation entre le taux d'œstradiol lors de la décision du déclenchement, le recueil ovocytaire, le nombre d'ovocytes obtenus en métaphase II, le nombre d'embryons obtenus, le nombre de blastomères par embryon et la fragmentation embryonnaires (Test du Khi deux).

On retrouve des taux d'E2 en moyenne inférieurs en cas d'anomalies ovocytaires mais cette différence n'est pas significative.

- L'étude ne retrouve pas de corrélation entre le taux de **FSH à J3** et la qualité ovocytaire.

Le taux de **FSH à J3** est intéressant car il est significativement corrélé négativement avec le nombre d'ovocytes ponctionnés, le nombre d'ovocytes en métaphase II et le nombre d'embryons

	Taux de FSH à J3	
	Coefficients de corrélation de Pearson : r	Significativité du test : p
CCO recueillis	-0,35	0,0002
Ovocytes en métaphase II	-0,33	0,005
Embryons obtenus	-0,34	0,0004
Blastomères par embryon à J2	-0,11	0,29
Fragmentation embryonnaire	-0,19	0,06

Tableau n°31 : Test de corrélation entre le taux de FSH à J3, le recueil ovocytaire, le nombre d'ovocytes obtenus en métaphase II, le nombre d'embryons obtenus, le nombre de blastomères par embryon et la fragmentation embryonnaires (Test du Khi deux)

– Entre le **protocole agoniste ou antagoniste**, l'étude ne retrouve pas de différence significative concernant la qualité ovocytaire. Par contre, une augmentation significative du nombre de blastomères à J2 et un meilleur grade embryonnaire sont retrouvés avec le protocole antagoniste (p=0.007). Une tendance à l'augmentation du nombre d'ovocytes ponctionnés, du nombre d'ovocytes en métaphase II et d'embryons, est retrouvée avec le protocole antagoniste mais celle-ci n'est pas significative.

	Agoniste	Antagoniste	Test de Student : p
CCO recueillis (n)	9,33	11,73	0,07
Ovocytes en métaphase II (n)	6,14	6,72	0,57
Embryons obtenus (n)	3,89	4,61	0,4
Blastomères par embryon à J2 (n)	2,91	4,08	0,007
Taux de fragmentation (%)	10,09	11,96	0,52

(n) : nombre moyen par tentative

Tableau n°32 : Comparaison du recueil ovocytaire et de critères quantitatifs et qualitatifs embryonnaires entre les patientes sous agoniste ou antagoniste de la LH-RH (Test de Student)

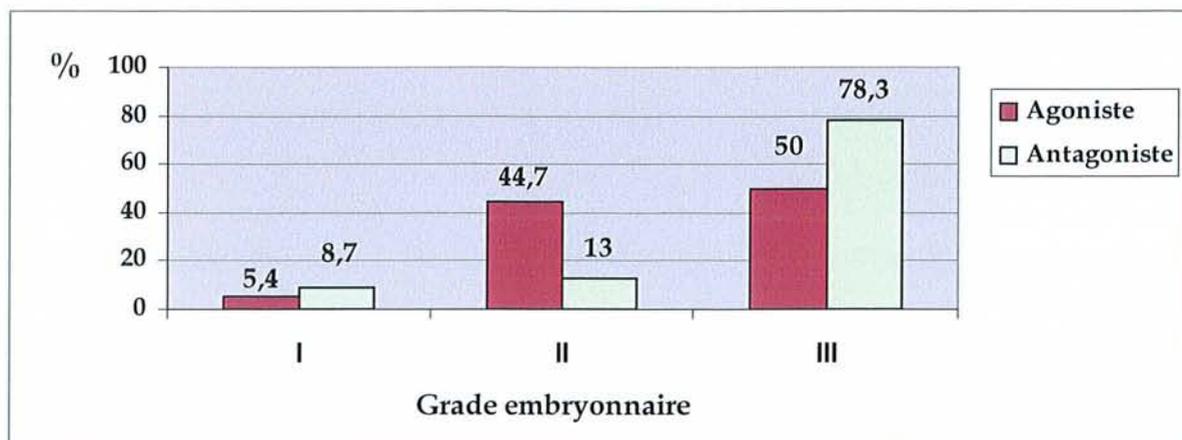


Figure 29: Comparaison des grades embryonnaires selon le protocole agoniste ou antagoniste de la LH-RH. Test de Fisher ($p < 0.058$)

- Concernant **le type de gonadotrophine**, il n'existe pas de différence significative retrouvée entre la FSH recombinante la FSH urinaire et l'hMG, en termes de qualité ovocytaire, en termes de nombre d'embryon obtenus. Concernant le grade embryonnaire celui-ci est significativement supérieur avec la FSH recombinante, puis FSH urinaire et enfin le moins bon avec l'hMG. ($p < 0.01$).

- Durée de la stimulation

Le test du Khi deux dans notre étude ne retrouve pas de corrélation entre la durée de la stimulation ovarienne et la qualité ovocytaire, le nombre de CCO recueillis, le nombre d'ovocytes microinjectés, le nombre d'embryons obtenus, le nombre de blastomères à J2, la qualité embryonnaire.

- **La dose totale de gonadotrophines** est significativement corrélée à la qualité ovocytaire. La dose totale est significativement supérieure en cas d'anomalie du cytoplasme, de la zone pellucide, de l'espace périvitellin.

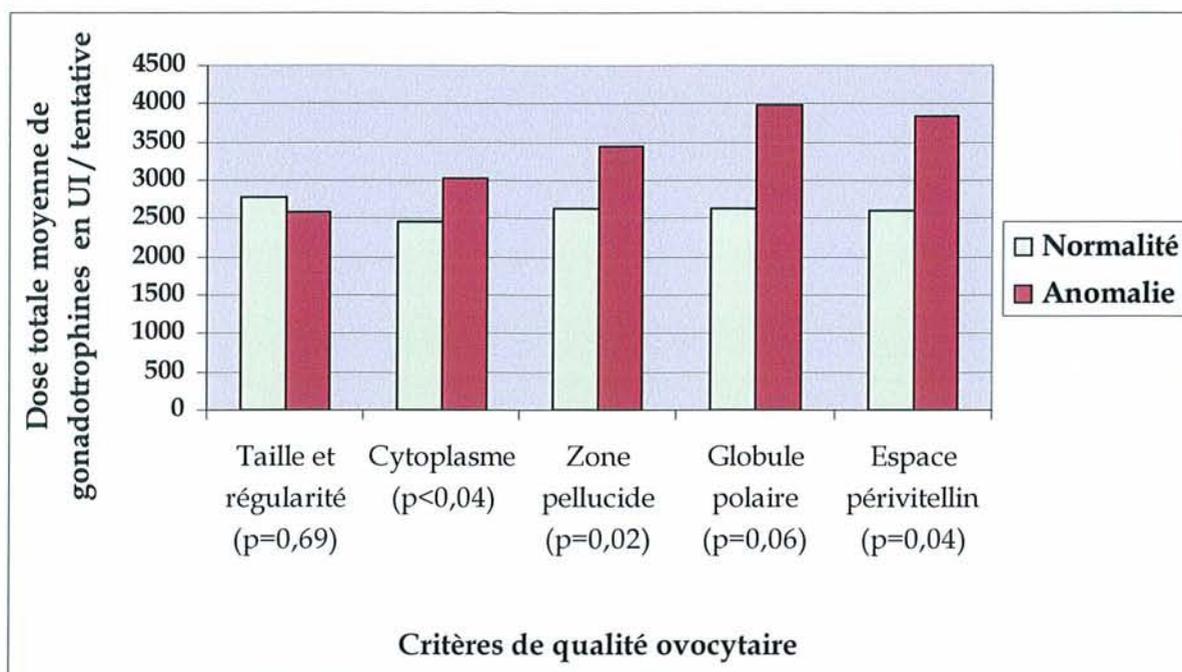


Figure 30 : Comparaison des doses moyennes totales de gonadotrophines selon la présence ou non d'anomalies ovocytaires. Test de Fisher

La dose totale de gonadotrophines est négativement corrélée, de façon significative, au nombre d'ovocytes ponctionnés, au nombre d'ovocytes en métaphase II et au nombre d'embryons obtenus et de façon moins significative au nombre de blastomères à J2.

	Dose totale de gonadotrophines	
	Coefficients de corrélation de Pearson : r	Significativité du test : p
CCO recueillis	-0,46	<0,0001
Ovocytes en métaphase II	-0,42	<0,0001
Embryons obtenus	-0,36	<0,0001
Nombre de blastomères à J2	-0,24	0,02
Fragmentation embryonnaire	-0,05	0,69

Tableau n°33 : Test de corrélation entre la dose totale de gonadotrophines, le recueil ovocytaire, le nombre d'ovocytes obtenus en métaphase II, le nombre d'embryons obtenus, le nombre de blastomères par embryon et la fragmentation embryonnaires (Test du Khi deux)

3.3.3. Paramètres masculins

Notre étude ne retrouve pas de corrélation entre l'âge de l'homme, la **concentration** spermatique, le pourcentage de **mobilité** spermatique, le pourcentage de **formes typiques**, et le nombre d'embryons obtenus, le nombre de blastomères par embryon, ni les critères de qualité embryonnaire.

Cependant, une corrélation négative est obtenue entre le **tabagisme de l'homme** et le nombre d'embryons obtenus de façon peu significative, sans corrélation avec la qualité embryonnaire retrouvée.

	Tabagisme masculin	
	Coefficients de corrélation de Pearson : r	Significativité du test : p
Nombre d'embryons obtenus	-0,17	0,08
Nombre de blastomères à J2	-0,15	0,13
Fragmentation embryonnaire	0,02	0,8

Tableau n°34 : Test de corrélation entre le tabagisme masculin, le nombre d'embryons obtenus, le nombre de blastomères par embryon et la fragmentation embryonnaires (Test du Khi deux)

4. Discussion

Nous n'étudions pas le devenir de l'ICSI selon l'âge maternel, cette corrélation a été mise en avant par d'innombrables études citées précédemment, en matière de fécondation et d'implantation, car il s'agit du critère d'appariement entre le groupe des cas et celui des témoins.

Les taux de fécondation n'ont pas été calculés puisque l'échantillon de population analysé a été sélectionné par le critère d'absence de remplacement embryonnaire comprenant les échecs de fécondation et un effectif double de témoins a été choisi pour la comparaison. Ces taux seraient biaisés par la sélection de la population analysée.

Certaines données insuffisamment renseignées, absentes ou communes à l'ensemble de la population n'ont pu être étudiées, telles que l'IMC de l'homme, l'exposition à des facteurs environnementaux toxiques, certains paramètres techniques biologiques, le milieu de culture,

le matériel utilisé, le délai entre la ponction et la micro-injection des spermatozoïdes, la présence d'une leucospermie, la technique de sélection des spermatozoïdes, les paramètres cinétiques du spermatozoïde, la fragmentation de l'ADN spermatique.

L'analyse des paramètres liés à la qualité ovocytaire ou embryonnaire a été effectuée sur la population totale de l'étude, celle-ci ayant été constituée pour l'étude cas-témoins avec le nombre de témoins étant double des cas, elle n'est pas strictement comparable à la population standard en AMP. Une extrapolation à la population générale ne peut être faite.

Notre étude n'a pas pris en compte le milieu de culture utilisé en ICSI, l'huile minérale, les paramètres techniques tels que la pipette de micro-injection, le micro-injecteur, les chambres d'incubation soit du fait de l'uniformité des pratiques, soit du fait de la faisabilité et des limites statistiques. La différence entre les techniciens de FIV ayant effectué la micro-injection, n'a délibérément pas été étudiée devant la proximité de leurs résultats. De plus, cette étude n'entre pas dans le cadre d'une évaluation de pratiques professionnelles.

Dans cette étude, le taux de FSH à J3, appartenant à la réserve ovarienne est un paramètre pronostique négatif, plus il est élevé, plus on est à risque d'absence de remplacement embryonnaire. Le taux d'œstradiol au moment de la décision du déclenchement, dépendant du recrutement ovocytaire suite au traitement de stimulation, est un facteur pronostic positif, ce qui est en accord avec la littérature.

Les indications de l'ICSI sont différemment réparties entre les cas et les témoins de façon significative. Ainsi si la tendance actuelle est à une extension des indications de l'ICSI en pratique courante avec une augmentation des étiologies féminines, on note que dans notre étude, cette indication est aussi associée à un plus grand risque d'absence de remplacement embryonnaire. Les indications pour oligoasthénospermies sont également proportionnellement, plus nombreuses chez les cas, mais l'imprécision et la variabilité de cette indication ne nous permet pas de conclure.

Notre étude ne retrouve pas de différence significative de répartition des SOPK, patientes endométriosiques, dysovulatoires et obèses chez les cas et les témoins. Mais une significativité telle que $p = 0.1$ ou $p = 0.2$, laisse à penser qu'une augmentation de l'effectif de la population pourrait permettre de mettre en évidence cette différence car il se dégage chez

les cas une tendance à l'augmentation du nombre de patientes SOPK et porteuses d'endométriase.

Le nombre de patientes obèses inclus dans cette étude ne permet qu'une étude limitée de l'impact de l'obésité sur la fécondation en ICSI. La proportion de patientes obèses chez les cas semble légèrement supérieure.

Sur la population totale, aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant la réponse à la stimulation, la qualité ovocytaire et embryonnaire entre les femmes obèses et non obèses. Cependant ces données sont en accord avec d'autres études de cohortes sur de plus grandes populations telles que celle de Déchaud ou Awartini.

Dechaud et al, en 2006, ont évalué de façon rétrospective, les résultats, selon l'Index de Masse Corporelle (IMC) de 573 patients infertiles, de 789 cycles de FIV classique ou d'ICSI (20). Les étiologies étant l'infertilité masculine, l'origine tubaire, ou l'infertilité inexplicée, les patients sont répartis en 4 groupes : IMC < 20kg/m² (264 cycles), IMC entre 20 et 25kg/m² (394 cycles), IMC entre 25 et 30 kg/m² (83 cycles) et IMC ≥ 30kg/m² (48 cycles). Chacune a bénéficié d'un protocole agoniste long et FSH recombinante. Tous les paramètres de la FIV sont comparables (taux d'annulation du cycle de stimulation, taux d'implantation, taux de grossesse) mais les patientes obèses nécessitent de plus fortes doses de FSH recombinantes pour achever la maturation ovocytaire, dès que l'IMC dépasse 30 kg/m² (p=0.0003). Pour l'équipe de Dechaud, l'obésité n'affecte pas négativement les résultats de la FIV.

Awartini s'est intéressé au traitement de l'infertilité des patients obèses, en les différenciant selon la gravité de l'obésité (157). Son étude de cohorte rétrospective a inclus des patients d'IMC supérieur à 30kg/m², de 20 à 40 ans, de premier rang de stimulation pour une FIV ou une ICSI pour une infertilité primaire avec un protocole agoniste long. Ont été définis le groupe A comprenant 406 patients obèses, à 32.1kg/m² d'IMC moyen et le groupe B comprenant 141 patientes ayant une obésité morbide avec un IMC moyen à 37.7kg/m². Le groupe B, comparé au groupe A, fait état de moins de follicules mûrs et de taille intermédiaire (14 versus 16), moins d'ovocytes collectés (7 versus 9), de plus fortes doses totales d'HMG utilisées (46.2 versus 38.5 ampoules), de façon significative (p<0.05). Le taux d'annulation y est supérieur, (28.3% versus 19%), le taux de grossesse par cycle y est moindre (19.9% versus 28.6%). Cependant, les taux de fécondation en FIV et ICSI ainsi que le nombre d'embryons transférés étaient similaires dans les 2 groupes.

L'impact péjoratif de l'obésité sur l'issue de l'ICSI est discuté. Si la stimulation est plus difficile et longue, d'autant plus lorsque l'obésité est importante ; les taux d'implantation de ces patientes méritent que l'on s'y intéresse lorsque des taux de grossesse par cycle sont constatés comme inférieurs, tout en retrouvant des taux de fécondation identiques. Les conditions techniques de recueil ovocytaires sont aussi plus complexes et les complications obstétricales plus nombreuses telles que le diabète gestationnel, l'HTA... Il est actuellement admis que le bénéfice d'une perte de poids en matière de fertilité chez les patientes obèses est certain.

Dans la population globale, chez les patientes porteuses d'un SOPK, une augmentation significative du nombre d'ovocytes ponctionnés avec une tendance non significative à l'augmentation des ovocytes en métaphase II, est en accord avec les données plus récentes de la littérature.

Certains auteurs tels que Salazar en 2008, avaient rapporté un nombre d'ovocytes immatures plus important chez les patientes porteuses d'un SOPK, et l'expliquaient par une anomalie intrinsèque de l'ovocyte, un environnement hormonal inadéquat ou une expression moindre du facteur VEGF 9. D'autres auteurs comme Ensiler ou Mendes-Pereira en 2006, dans des séries utilisant exclusivement l'ICSI, ont montré que ces patientes produisent autant d'ovocytes matures que les témoins, comme c'est le cas dans notre étude.

Dans sa série de 100 patientes porteuses de SOPK, bénéficiant de l'ICSI, Kdous retrouve un taux significativement plus élevé d'ovocytes matures (67% versus 52%) avec un taux de fécondation supérieur pour ce même groupe (75% versus 63.7%, $p < 0.001$) (158).

Les données de la littérature font état d'un taux de fécondation en ICSI au moins similaire entre les patientes SOPK et les témoins. Hwang en 2005 retrouve une amélioration des taux de fécondation des patientes SOPK par l'ICSI (72% versus 44.8%, $p < 0.05$) expliquant cette différence par une plus grande proportion d'anomalies de la zone pellucide constatées dans son étude chez les SOPK. Notre étude ne retrouve qu'une augmentation significative des anomalies du cytoplasme ovocytaire et ne corrobore pas cette hypothèse.

Concernant la qualité embryonnaire, la littérature (159, 160) retrouve une qualité au moins similaire des embryons issus de patientes SOPK. Notre étude ne retrouve pas de différence significative entre ces patientes et les normo-ovulantes.

Plachot et al. en 2003 ont démontré une cinétique de division similaire au groupe témoin chez les patientes SOPK (161). Notre étude ne retrouve pas de différence significative à ce sujet, par un nombre moyen de blastomères à J2 non différent entre les SOPK et les normo-

ovulantes. Hardy et al. ont retrouvé un taux similaire d'évolution au stade blastocyste chez les patientes SOPK et les témoins.

Si notre étude ne se projette pas au-delà du remplacement embryonnaire en ICSI, la littérature est conflictuelle concernant l'implantation ; certains prônent que les taux élevés d'œstradiol comme c'est le cas dans le SOPK s'associent à une mauvaise implantation mais des études récentes (Mendes-Pereira et al. Ludwig et al.) retrouvent des taux d'implantation comparables entre cas et témoins. Enfin, concernant les taux de naissance chez les patientes SOPK suite à une ICSI, la méta-analyse de Heijnen et al. en 2006 retrouve des taux comparables entre patientes SOPK et témoins (162). En Grande-Bretagne, les recommandations nationales exigent un IMC inférieur à 30 avant de débiter toute stimulation ovarienne chez les femmes OPK; certains praticiens se contentent toutefois d'une cinétique pondérale décroissante, et non d'une valeur absolue d'IMC, avant de débiter une prise en charge thérapeutique de l'infertilité.

Concernant l'impact de l'endométriose, si celle-ci est légèrement plus fréquente mais de façon non significative, tous stades confondus, en cas de non-replacement embryonnaire.

Notre étude n'a pu mettre en évidence une altération significative de la qualité ovocytaire ni embryonnaire chez les patientes porteuses d'une endométriose. Mais notre étude ne permettait pas d'isoler les endométrioses de bas grades de meilleur pronostic que celles de haut grade. Les données de la littérature décrites précédemment sont par ailleurs très conflictuelles sur le sujet.

Concernant les paramètres de stimulation, la répartition des agonistes et antagonistes chez les cas et témoins n'est pas significativement différente.

Concernant l'étude sur l'ensemble de la population de la qualité ovocytaire, de la quantité et de la qualité embryonnaire, les antagonistes n'ont été utilisés que pour 26 tentatives, soit un faible effectif et en priorité chez les patientes plus jeunes et à risque d'hyperstimulation qui présentent en conséquence, une meilleure réponse à la stimulation. Ainsi, il est logique que ces patientes de meilleur pronostic aient une meilleure réponse en termes de qualité ovocytaire, de quantité et de qualité embryonnaire ce qui est pourtant en contradiction avec les dernières méta-analyses comparant agonistes et antagonistes. Mais l'échantillon étudié n'est pas révélateur de la population standard.

Concernant les gonadotrophines utilisées, l'utilisation majoritaire de la FSH recombinante est en accord avec les données de la littérature qui retrouvent de meilleurs résultats en termes de réponse à la stimulation, de taux de fécondation en ICSI, de qualité embryonnaire et de taux

de grossesse dans une population globale. Mais ce ratio en faveur de la FSH recombinante ne permet pas une véritable comparaison aux autres gonadotrophines.

Dans l'étude, la description morphologique des ovocytes malgré sa part subjective, est significativement prédictive du résultat de l'ICSI, sauf pour le paramètre de régularité et la taille ovocytaire.

La présence d'un premier globule polaire anormal, d'un espace péri-vitellin élargi, d'une zone pellucide épaisse ou irrégulière, d'une granularité cytoplasmique accrue de façon diffuse ou en taches, semble donc avoir un impact négatif sur le potentiel ovocytaire à être fécondé et à cliver et donner des embryons de bonne qualité en ICSI. Ces résultats sont conformes aux données de la littérature relatées précédemment. La présence d'un 1^{er} globule polaire altéré chez les ovocytes en métaphase II peut refléter un asynchronisme entre la maturation nucléaire et cytoplasmique, alors qu'un 1^{er} globule polaire trop large peut être le reflet d'une distension du fuseau méiotique. Ceci pourrait expliquer la plus faible capacité à former le pronucléus après l'ICSI et le moindre développement embryonnaire.

Une maturité trop importante peut être responsable d'un élargissement de l'espace péri-vitellin, affectant significativement la fécondation et la formation du pronucléus. Inversement, les altérations du cytoplasme telles que l'augmentation de la granularité, une localisation centrale d'une aire granulaire, sont plutôt en faveur d'une immaturité, qui est elle associée à un faible développement zygotique et une faible qualité embryonnaire.

Concernant les paramètres masculins, les données de l'étude concernant l'âge sont en accord avec la littérature qui note peu ou pas d'impact de l'âge paternel sur la fécondation en ICSI. Cependant, l'impact sur le résultat de l'ICSI ne serait pas nul en termes de taux d'aneuploïdie et d'implantation de l'embryon.

Il est surprenant de voir le peu d'impact retrouvé dans notre étude, du tabac chez l'homme concernant le nombre et la qualité des embryons obtenus.

Le tabac, favorisant la fragmentation et l'altération de l'ADN spermatique est un paramètre reconnu d'altération de la capacité fécondante du spermatozoïde en fécondation naturelle et en AMP. Il ne faut cependant pas conclure à l'absence d'effet néfaste mais plutôt à une limite de l'étude.

En effet, la proportion de fumeurs est importante (>44%) chez les cas comme chez les témoins, proche du double de la consommation de la population féminine. La quantité de

tabac réellement ingérées est difficilement évaluable en l'absence de mesure objective comme le taux de CO.

Si les conseils de sevrage du tabagisme chez l'homme font déjà partie de l'information donnée pendant la consultation, peut-être que les hommes se sentent moins concernés par le problème. La lutte contre le tabagisme avant la FIV ICSI peut sans doute s'intensifier chez les hommes en essayant de plus les impliquer dans le projet. La motivation personnelle reste cependant indépendante.

De même, les facteurs toxiques pour la spermatogénèse par une exposition professionnelle ou une intoxication délibérée doivent être plus recherchés avec une mise en place de mesures préventives dans les milieux professionnels et d'une information plus complète sur l'impact du cannabis et d'autres drogues. Notre enquête sur la consommation de toxiques tels que le cannabis est sans doute non exhaustive du fait de la difficulté pour le patient d'évoquer le sujet.

La concentration spermatique est un paramètre qui a peu d'importance en ICSI tant que suffisamment de spermatozoïdes vivants, mobiles sont retrouvés pour la tentative, au mieux en recueil frais, sinon congelé, si les numérations spermatiques des recueils sont significativement supérieures chez les témoins par rapport aux cas, l'étude de corrélation sur l'ensemble de la population, entre la numération spermatique et le nombre d'embryons obtenus et ses critères de qualité ne retrouve pas de corrélation.

La mobilité et le pourcentage de formes typiques ne sont pas plus démonstratifs dans cette étude sans différence significative entre les cas et les témoins.

Dans cette étude, l'analyse de la morphologie effectuée en microscopie optique a ses limites, et est soumise à la subjectivité de l'opérateur. Une étude plus détaillée de la morphologie spermatique avant ICSI, comme lors de l'IMSI ou par la microscopie électronique pourrait préciser l'impact de la morphologie spermatique sur le devenir de l'ICSI. La littérature a démontré cet impact et retrouve une augmentation du taux de fécondation et du taux d'embryons obtenus par l'IMSI, détaillée précédemment. L'IMSI étant chronophage, certaines équipes ont tenté de la comparer à une autre méthode de sélection du spermatozoïde par la capacité à se lier à l'acide hyaluronique, lorsque celui-ci est mature et non altéré.

5. Conclusion

Que peut-on dire aux patients ? Quels paramètres influencent la possibilité d'effectuer un remplacement embryonnaire ou pas ?

La littérature valide de façon consensuelle le principal paramètre à prendre en compte qui est l'âge de la femme. Nous n'avons pas cherché à le remettre en question.

La réserve ovarienne est un paramètre important. Le taux de FSH au troisième jour du cycle, le taux d'œstradiol au déclenchement, dépendant du recrutement ovocytaire ainsi que la dose totale de gonadotrophines utilisées, témoin de la réponse de l'ovaire à la stimulation, sont des paramètres dont il faut tenir compte.

L'étude met en évidence l'impact du tabac chez la femme sur le risque d'absence de remplacement embryonnaire après ICSI.

Chez l'homme, ni l'âge ni les paramètres spermatiques tels qu'ils sont décrits dans la pratique quotidienne, ne sont significativement corrélés au fait d'obtenir un embryon transférable.

Cependant, l'étude révèle également qu'une attention moindre est apportée aux paramètres cliniques masculins, tant dans l'enquête étiologique que le suivi du respect de règles hygiéno-diététiques. La proportion de fumeurs, sur la population totale, est beaucoup plus importante chez les hommes par rapport aux femmes. De plus, il reste difficile d'évaluer une consommation objective de tabac et de toxiques ingérés. L'accent peut être mis sur la nécessité d'un sevrage tabagique et des toxiques pour chaque membre du couple.

Le nombre d'ovocytes recueillis, d'autant plus le nombre d'ovocytes en métaphase II micro-injectables et la qualité ovocytaire sont déterminants pour le pronostic de l'ICSI. Les critères morphologiques ovocytaires décrivant le cytoplasme, l'espace périvitellin, la zone pellucide et le premier globule polaire nous apportent des précisions pronostiques sur l'issue de la micro-injection.

La littérature nous apprend également que l'amélioration des résultats de l'ICSI semble aussi passer par une meilleure sélection des gamètes comme le montre la recherche actuelle concernant l'analyse morphologique plus fine du spermatozoïde et de l'ovocyte, l'IMSI et l'activation ovocytaire. La biologie moléculaire, la cytogénétique et les nouvelles techniques comme la protéomique nous permettront peut-être de mieux cerner les patients à risque d'échec et seront peut-être à l'avenir les nouveaux alliés du praticien en AMP.

6. Bibliographie

1. Abdelmassih R, Sollia S, Moretto M, Acosta AA. Female age is an important parameter to predict treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1996; 65:573-577.
2. Lim AS, Tsakok MF. Age-related decline in fertility: a link to degenerative oocytes? *Fertil Steril* 1997; 68:265-271.
3. Alrayyes S, Fakh H, Khan I. Effect of age and cycle responsiveness in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1997; 68:123-127.
4. Szamatowicz M, Grochowski D. Fertility and infertility in aging women. *Gynecol Endocrinol* 1998; 12:407-413.
5. Tucker MJ, Morton PC, Wright G, Ingargiola PE, Jones AE, Sweitzer CL. Factors affecting success with intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7:229-236.
6. Timeva T, Milachich T, Petkova L, Barov D, Shterev A. [Assesment of the woman's age as a main predictive factor of assisted reproductive technology treatment outcome]. *Akush Ginekol (Sofia)* 2006; 45:22-27.
7. Lewis S, Klonoff-Cohen H. What factors affect intracytoplasmic sperm injection outcomes? *Obstet Gynecol Surv* 2005; 60:111-123.
8. Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Ramsay JW. Effect of time since vasectomy and maternal age on intracytoplasmic sperm injection success in men with obstructive azoospermia after vasectomy. *Fertil Steril* 2004; 82:367-373.
9. Piette C, de Mouzon J, Bachelot A, Spira A. In-vitro fertilization: influence of women's age on pregnancy rates. *Hum Reprod* 1990; 5:56-59.
10. Lamarche C, Levy R, Felloni B, et al. [Assisted reproductive techniques in women aged 38 years or more]. *Gynecol Obstet Fertil* 2007; 35:420-429.
11. Zorn B, Virant-Klun I, Drobni S, Sinkovec J, Meden-Vrtovec H. Male and female factors that influence ICSI outcome in azoospermia or aspermia. *Reprod Biomed Online* 2009; 18:168-176.
12. Shen S, Khabani A, Klein N, Battaglia D. Statistical analysis of factors affecting fertilization rates and clinical outcome associated with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2003; 79:355-360.
13. Cassuto NG, Bouret D, Plouchart JM, et al. A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality. *Fertil Steril* 2008.
14. Bar-Hava I, Ferber A, Ashkenazi J, et al. Does female age affect embryo morphology? *Gynecol Endocrinol* 1999; 13:371-374.

15. Bar-Hava I, Orvieto R, Ferber A, Ashkenazi J, Dicker D, Ben-Rafael Z. Standard in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection in advanced female age--what may be expected? *Gynecol Endocrinol* 1999; 13:93-97.
16. Rosen MP, Shen S, Dobson AT, Fujimoto VY, McCulloch CE, Cedars MI. Oocyte degeneration after intracytoplasmic sperm injection: a multivariate analysis to assess its importance as a laboratory or clinical marker. *Fertil Steril* 2006; 85:1736-1743.
17. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003; 18:323-327.
18. Brodin T, Bergh T, Berglund L, Hadziosmanovic N, Holte J. High basal LH levels in combination with low basal FSH levels are associated with high success rates at assisted reproduction. *Hum Reprod* 2009.
19. Ebner T, Sommergruber M, Moser M, Shebl O, Schreier-Lechner E, Tews G. Basal level of anti-Mullerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. *Hum Reprod* 2006; 21:2022-2026.
20. Dechaud H, Anahory T, Reyftmann L, Loup V, Hamamah S, Hedon B. Obesity does not adversely affect results in patients who are undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 127:88-93.
21. Moore VM, Davies MJ, Willson KJ, Worsley A, Robinson JS. Dietary composition of pregnant women is related to size of the baby at birth. *J Nutr* 2004; 134:1820-1826.
22. Tortoriello DV, McMinn J, Chua SC. Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice. *Endocrinology* 2004; 145:1238-1247.
23. Pasquali R, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M, Gambineri A. Obesity and reproductive disorders in women. *Hum Reprod Update* 2003; 9:359-372.
24. Wang JX, Warnes GW, Davies MJ, Norman RJ. Overweight infertile patients have a higher fecundity than normal-weight women undergoing controlled ovarian hyperstimulation with intrauterine insemination. *Fertil Steril* 2004; 81:1710-1712.
25. Dokras A, Baredziak L, Blaine J, Syrop C, VanVoorhis BJ, Sparks A. Obstetric outcomes after in vitro fertilization in obese and morbidly obese women. *Obstet Gynecol* 2006; 108:61-69.
26. Gillett WR, Putt T, Farquhar CM. Prioritising for fertility treatments--the effect of excluding women with a high body mass index. *Bjog* 2006; 113:1218-1221.
27. Lintsen AM, Pasker-de Jong PC, de Boer EJ, et al. Effects of subfertility cause, smoking and body weight on the success rate of IVF. *Hum Reprod* 2005; 20:1867-1875.
28. Teixeira Filho FL, Baracat EC, Lee TH, et al. Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1337-1344.

29. Juengel JL, McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update* 2005; 11:143-160.
30. Wood JR, Dumesic DA, Abbott DH, Strauss JF, 3rd. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:705-713.
31. Fabregues F, Penarrubia J, Vidal E, Casals G, Vanrell JA, Balasch J. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome: a self-controlled clinical study. *Fertil Steril* 2004; 82:827-833.
32. Collinet P, Decanter C, Lefebvre C, Leroy JL, Vinatier D. [Endometriosis and infertility]. *Gynecol Obstet Fertil* 2006; 34:379-384.
33. Navarro J, Garrido N, Remohi J, Pellicer A. How does endometriosis affect infertility? *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003; 30:181-192.
34. Garrido N, Navarro J, Garcia-Velasco J, Remohi J, Pellice A, Simon C. The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. *Hum Reprod Update* 2002; 8:95-103.
35. Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 96:21-34.
36. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, et al. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 2003; 144:2870-2881.
37. Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohi J, Simon C. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1995; 10 Suppl 2:91-97.
38. Brizek CL, Schlaff S, Pellegrini VA, Frank JB, WorriLOW KC. Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis--an association with endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12:106-112.
39. Tinkanen H, Kujansuu E. In vitro fertilization in patients with ovarian endometriomas. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79:119-122.
40. Donnez J, Wyns C, Nisolle M. Does ovarian surgery for endometriomas impair the ovarian response to gonadotropin? *Fertil Steril* 2001; 76:662-665.
41. Al-Azemi M, Bernal AL, Steele J, Gramsbergen I, Barlow D, Kennedy S. Ovarian response to repeated controlled stimulation in in-vitro fertilization cycles in patients with ovarian endometriosis. *Hum Reprod* 2000; 15:72-75.
42. Olivennes F, Feldberg D, Liu HC, Cohen J, Moy F, Rosenwaks Z. Endometriosis: a stage by stage analysis--the role of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995; 64:392-398.

43. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Al-Inany HG, Aboulghar MM. The outcome of in vitro fertilization in advanced endometriosis with previous surgery: a case-controlled study. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:371-375.
44. Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002; 77:1148-1155.
45. de Mouzon J, Spira A, Schwartz D. A prospective study of the relation between smoking and fertility. *Int J Epidemiol* 1988; 17:378-384.
46. de Mouzon J, Belaisch-Allart J. [Consequences on women's fecundity and on assisted reproductive technology]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2005; 34 Spec No 1:3S112-118.
47. Ebner T, Moser M, Shebl O, Sommerguber M, Tews G. Prognosis of oocytes showing aggregation of smooth endoplasmic reticulum. *Reprod Biomed Online* 2008; 16:113-118.
48. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, et al. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertil Steril* 2005; 83:1635-1640.
49. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000; 15:427-430.
50. Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, et al. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril* 2008; 90:1692-1700.
51. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Puchner M, Wiesinger R, Tews G. Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Hum Reprod* 2003; 18:1294-1298.
52. Chen W, Hu J, Liu Q, Wei YL, Zhu GJ. [Influence of maternal age on meiotic spindle and chromosome configuration of oocytes]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2007; 24:6-9.
53. Shen Y, Stalf T, Mehnert C, et al. Light retardance by human oocyte spindle is positively related to pronuclear score after ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006; 12:737-751.
54. Hardarson T, Lundin K, Hamberger L. The position of the metaphase II spindle cannot be predicted by the location of the first polar body in the human oocyte. *Hum Reprod* 2000; 15:1372-1376.
55. Wang WH, Keefe DL. Spindle observation in living mammalian oocytes with the polarization microscope and its practical use. *Cloning Stem Cells* 2002; 4:269-276.
56. Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son WY, Yoon SH, Lim JH. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. *Hum Reprod* 2003; 18:817-820.

57. Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Oldenbourg R, Keefe DL. Rigorous thermal control during intracytoplasmic sperm injection stabilizes the meiotic spindle and improves fertilization and pregnancy rates. *Fertil Steril* 2002; 77:1274-1277.
58. Madaschi C, Aoki T, de Almeida Ferreira Braga DP, et al. Zona pellucida birefringence score and meiotic spindle visualization in relation to embryo development and ICSI outcomes. *Reprod Biomed Online* 2009; 18:681-686.
59. Royere D, Guerif F. [Preimplantation embryo development: current status and perspectives in clinical embryology]. *Gynecol Obstet Fertil* 2008; 36:1119-1125.
60. Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod* 1997; 12:1750-1755.
61. Vialard F, Pellestor F. [Benefit of human gamete cytogenetics: results and perspectives]. *Pathol Biol (Paris)* 2008; 56:388-399.
62. Vialard F, Gomes DM, Hammoud I, et al. Stability of aneuploidy rate in polar bodies in two cohorts from the same patient. *Reprod Biomed Online* 2008; 17:213-219.
63. Waizenegger IC, Hauf S, Meinke A, Peters JM. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 2000; 103:399-410.
64. Marston AL, Amon A. Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:983-997.
65. Simoni M, Tempfer CB, Destenaves B, Fauser BC. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: Polycystic ovary syndrome and ovarian response. *Hum Reprod Update* 2008; 14:459-484.
66. Behre HM, Greb RR, Mempel A, et al. Significance of a common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene for the ovarian response to FSH: a pharmacogenetic approach to controlled ovarian hyperstimulation. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15:451-456.
67. Simpson JL. Genetic and phenotypic heterogeneity in ovarian failure: overview of selected candidate genes. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1135:146-154.
68. Vialard F, Hammoud I, Molina-Gomes D, et al. Gamete cytogenetic study in couples with implantation failure: aneuploidy rate is increased in both couple members. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25:539-545.
69. Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, et al. Anti-Mullerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:1796-1802.

70. Ledee N, Lombroso R, Lombardelli L, et al. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Hum Reprod* 2008; 23:2001-2009.
71. Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, Guerif F, Bidault R, Royere D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Hum Reprod* 2007; 22:3069-3077.
72. de Mouzon J, Rossin-Amar B, Bachelot A, Renon C, Devecchi A. FIVNAT. Influence of attempt rank in in vitro fertilization]. *Contracept Fertil Sex* 1998; 26:466-472.
73. Felberbaum RE, Diedrich K. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists: will they replace the agonists? *Reprod Biomed Online* 2003; 6:43-53.
74. Greco E, Litwicka K, Ferrero S, et al. GnRH antagonists in ovarian stimulation for ICSI with oocyte restriction: a matched, controlled study. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:572-578.
75. Pinto F, Oliveira C, Cardoso MF, et al. Impact of GnRH ovarian stimulation protocols on intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:5.
76. Xavier P, Gamboa C, Calejo L, et al. A randomised study of GnRH antagonist (cetorelix) versus agonist (busereline) for controlled ovarian stimulation: effect on safety and efficacy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 120:185-189.
77. Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar M. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception: a Cochrane review. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:640-649.
78. Daya S, Gunby J. WITHDRAWN: Recombinant versus urinary follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2006:CD002810.
79. Hompes PG, Broekmans FJ, Hoozemans DA, Schats R. Effectiveness of highly purified human menopausal gonadotropin vs. recombinant follicle-stimulating hormone in first-cycle in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril* 2008; 89:1685-1693.
80. Coomarasamy A, Afnan M, Cheema D, van der Veen F, Bossuyt PM, van Wely M. Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008; 23:310-315.
81. Kovacs P, Kovacs T, Kaali SG. Results with early follicular phase recombinant luteinizing hormone supplementation during stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2009.
82. Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, et al. Recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH-antagonist protocol: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:14-25.
83. Nakagawa K, Ohgi S, Nakashima A, Horikawa T, Sugiyama R, Saito H. The ratio of late-follicular to mid-follicular phase LH concentrations efficiently predicts ART outcomes in women undergoing ART treatment with GnRH-agonist long protocol and stimulation with recombinant FSH. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25:359-364.

84. Franco JG, Jr., Baruffi RL, Oliveira JB, et al. Effects of recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH-agonist protocol: a matched case-control study. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:58.
85. Guerin JF, de Mouzon J. [Paternal age and fertility]. *Contracept Fertil Sex* 1997; 25:515-518.
86. Spandorfer SD, Avrech OM, Colombero LT, Palermo GD, Rosenwaks Z. Effect of parental age on fertilization and pregnancy characteristics in couples treated by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13:334-338.
87. Aboulghar M, Mansour R, Al-Inany H, et al. Paternal age and outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:588-592.
88. Pasquali R. Obesity, fat distribution and infertility. *Maturitas* 2006; 54:363-371.
89. Kort HI, Massey JB, Elsner CW, et al. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 2006; 27:450-452.
90. Sallmen M, Sandler DP, Hoppin JA, Blair A, Baird DD. Reduced fertility among overweight and obese men. *Epidemiology* 2006; 17:520-523.
91. Glenn DR, McClure N, Lewis SE. The hidden impact of diabetes on male sexual dysfunction and fertility. *Hum Fertil (Camb)* 2003; 6:174-179.
92. Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, et al. Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod* 2007; 22:1871-1877.
93. Aoki VW, Wilcox AL, Thorp C, Hamilton BD, Carrell DT. Improved in vitro fertilization embryo quality and pregnancy rates with intracytoplasmic sperm injection of sperm from fresh testicular biopsy samples vs. frozen biopsy samples. *Fertil Steril* 2004; 82:1532-1535.
94. Koscinski I, Wittemer C, Lefebvre-Khalil V, Marcelli F, Defossez A, Rigot JM. Optimal management of extreme oligozoospermia by an appropriate cryopreservation programme. *Hum Reprod* 2007; 22:2679-2684.
95. Ravizzini P, Carizza C, Abdelmassih V, Abdelmassih S, Azevedo M, Abdelmassih R. Microdissection testicular sperm extraction and IVF-ICSI outcome in nonobstructive azoospermia. *Andrologia* 2008; 40:219-226.
96. Altay B, Kefi A, Tavmergen E, Cikili N, Semerci B, Tavmergen Goker E. The effects of female age on the outcome of testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with azoospermia. *Int Urol Nephrol* 2002; 33:95-99.
97. Ishikawa T, Shiotani M, Izumi Y, et al. Fertilization and pregnancy using cryopreserved testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection with azoospermia. *Fertil Steril* 2008.
98. Kanto S, Sugawara J, Masuda H, Sasano H, Arai Y, Kyono K. Fresh motile testicular sperm retrieved from nonobstructive azoospermic patients has the same potential to achieve fertilization and pregnancy via ICSI as sperm retrieved from obstructive azoospermic patients. *Fertil Steril* 2008; 90:2010 e2015-2017.

99. Slama R, Eustache F, Ducot B, et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2002; 17:503-515.
100. Mortimer D, Menkveld R. Sperm morphology assessment--historical perspectives and current opinions. *J Androl* 2001; 22:192-205.
101. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986; 46:1118-1123.
102. Bartoov B, Eltes F, Pansky M, Langzam J, Reichart M, Soffer Y. Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analyses. *Hum Reprod* 1994; 9:2069-2075.
103. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 2002; 23:1-8.
104. Ubaldi F, Rienzi L. Morphological selection of gametes. *Placenta* 2008; 29 Suppl B:115-120.
105. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, et al. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod* 2005; 20:185-190.
106. Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006; 12:19-25.
107. Junca AM, Cohen-Bacrie P, Hazout A. [ICSI: can one select the spermatozooids?]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2005; 34:1S31-34.
108. Yildirim G, Ficicioglu C, Akcin O, Attar R, Tecellioglu N, Yencilek F. Can pentoxifylline improve the sperm motion and ICSI success in the primary ciliary dyskinesia? *Arch Gynecol Obstet* 2009; 279:213-215.
109. Chantot-Bastarud S, Ravel C, Siffroi JP. Underlying karyotype abnormalities in IVF/ICSI patients. *Reprod Biomed Online* 2008; 16:514-522.
110. Schiff JD, Palermo GD, Veeck LL, Goldstein M, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Success of testicular sperm extraction [corrected] and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:6263-6267.
111. Yarali H, Polat M, Bozdog G, et al. TESE-ICSI in patients with non-mosaic Klinefelter syndrome: a comparative study. *Reprod Biomed Online* 2009; 18:756-760.
112. Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Schachter M, Bern O, Ron-El R. Outcome of ICSI using fresh and cryopreserved-thawed testicular spermatozoa in patients with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Hum Reprod* 2001; 16:2616-2620.
113. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006; 27:53-59.

114. Benchaib M, Braun V, Lornage J, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003; 18:1023-1028.
115. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2004; 19:611-615.
116. Avendano C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 2009.
117. Lemkecher T, Dartigues S, Vaysse J, et al. [Leucocytospermia, oxidative stress and male fertility: facts and hypotheses]. *Gynecol Obstet Fertil* 2005; 33:2-10.
118. Talbert LM, Hammond MG, Halme J, O'Rand M, Fryer JG, Ekstrom RD. Semen parameters and fertilization of human oocytes in vitro: a multivariable analysis. *Fertil Steril* 1987; 48:270-277.
119. Zorn B, Vidmar G, Meden-Vrtovec H. Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl* 2003; 26:279-285.
120. Branigan EF, Spadoni LR, Muller CH. Identification and treatment of leukocytospermia in couples with unexplained infertility. *J Reprod Med* 1995; 40:625-629.
121. Greco E, Romano S, Iacobelli M, et al. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod* 2005; 20:2590-2594.
122. Menezo YJ, Hazout A, Panteix G, et al. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:418-421.
123. Demiroglu A, Benkhalifa M, Sari T, Gurgan T. Use of laser-assisted intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in patients with a history of poor ICSI outcome and limited metaphase II oocytes. *Fertil Steril* 2006; 86:256-258.
124. Yavas Y, Roberge S, Khamsi F, Shirazi P, Endman MW, Wong JC. Performing ICSI using an injection pipette with the smallest possible inner diameter and a long taper increases normal fertilization rate, decreases incidence of degeneration and trippronuclear zygotes, and enhances embryo development. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18:426-435.
125. Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998; 13:1003-1013.
126. Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, et al. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod* 2007; 22:1973-1981.
127. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, et al. Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. *Hum Reprod* 2003; 18:2406-2412.

128. Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997; 12:1531-1536.
129. Sakkas D, Shoukir Y, Chardonens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998; 13:182-187.
130. Comizzoli P, Urner F, Sakkas D, Renard JP. Up-regulation of glucose metabolism during male pronucleus formation determines the early onset of the s phase in bovine zygotes. *Biol Reprod* 2003; 68:1934-1940.
131. Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001; 16:2652-2657.
132. Hesters L, Prisant N, Fanchin R, et al. Impact of early cleaved zygote morphology on embryo development and in vitro fertilization-embryo transfer outcome: a prospective study. *Fertil Steril* 2008; 89:1677-1684.
133. Shen S, Rosen MP, Dobson AT, Fujimoto VY, McCulloch CE, Cedars MI. Day 2 transfer improves pregnancy outcome in in vitro fertilization cycles with few available embryos. *Fertil Steril* 2006; 86:44-50.
134. Rosen MP, Shen S, Dobson AT, Fujimoto VY, McCulloch CE, Cedars MI. Triploidy formation after intracytoplasmic sperm injection may be a surrogate marker for implantation. *Fertil Steril* 2006; 85:384-390.
135. Dumont M. [Embryo quality and selection]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2008; 37 Suppl 1:S9-13.
136. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update* 2003; 9:251-262.
137. Hnida C, Engenheiro E, Ziebe S. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Hum Reprod* 2004; 19:288-293.
138. Alvarez C, Taronger R, Garcia-Garrido C, Gonzalez de Merlo G. Zygote score and status 1 or 2 days after cleavage and assisted reproduction outcome. *Int J Gynaecol Obstet* 2008; 101:16-20.
139. Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, et al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008; 23:91-99.
140. Staessen C, Platteau P, Van Assche E, et al. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2004; 19:2849-2858.

141. Jones GM, Cram DS, Song B, Kokkali G, Pantos K, Trounson AO. Novel strategy with potential to identify developmentally competent IVF blastocysts. *Hum Reprod* 2008; 23:1748-1759.
142. Katz-Jaffe MG, Gardner DK, Schoolcraft WB. Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *Fertil Steril* 2006; 85:101-107.
143. Scott R, Seli E, Miller K, Sakkas D, Scott K, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertil Steril* 2008; 90:77-83.
144. Lopes AS, Greve T, Callesen H. Quantification of embryo quality by respirometry. *Theriogenology* 2007; 67:21-31.
145. Baumann CG, Morris DG, Sreenan JM, Leese HJ. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Mol Reprod Dev* 2007; 74:1345-1353.
146. Cayli S, Jakab A, Ovari L, et al. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online* 2003; 7:462-468.
147. Huszar G, Jakab A, Sakkas D, et al. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:650-663.
148. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008; 23:2663-2668.
149. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M. "Physiologic ICSI": Hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril* 2009.
150. Sousa M, Tesarik J. Ultrastructural analysis of fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994; 9:2374-2380.
151. Gearon CM, Taylor AS, Forman RG. Factors affecting activation and fertilization of human oocytes following intracytoplasmic injection. *Hum Reprod* 1995; 10:896-902.
152. Terada Y, Hasegawa H, Takahashi A, Ugajin T, Yaegashi N, Okamura K. Successful pregnancy after oocyte activation by a calcium ionophore for a patient with recurrent intracytoplasmic sperm injection failure, with an assessment of oocyte activation and sperm centrosomal function using bovine eggs. *Fertil Steril* 2009; 91:935 e911-934.
153. Tesarik J, Rienzi L, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E. Use of a modified intracytoplasmic sperm injection technique to overcome sperm-borne and oocyte-borne oocyte activation failures. *Fertil Steril* 2002; 78:619-624.
154. Baltaci V, Ayvaz OU, Unsal E, et al. The effectiveness of intracytoplasmic sperm injection combined with piezoelectric stimulation in infertile couples with total fertilization failure. *Fertil Steril* 2009.

155. van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJ, et al. Predictive value of pregnancy history in subfertile couples: results from a nationwide cohort study in the Netherlands. *Fertil Steril* 2008; 90:521-527.
156. Wald M, Sparks AE, Sandlow J, Van-Voorhis B, Syrop CH, Niederberger CS. Computational models for prediction of IVF/ICSI outcomes with surgically retrieved spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2005; 11:325-331.
157. Awartani KA, Nahas S, Al Hassan SH, Al Deery MA, Coskun S. Infertility treatment outcome in sub groups of obese population. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:52.
158. Kdous M, Chaker A, Zhioua A, Zhioua F. [Oocyte and embryo quality and outcome of ICSI cycles in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) versus normo-ovulatory]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2009; 38:133-143.
159. Hwang JL, Seow KM, Lin YH, et al. IVF versus ICSI in sibling oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2005; 20:1261-1265.
160. Sahu B, Ozturk O, Ranierri M, Serhal P. Comparison of oocyte quality and intracytoplasmic sperm injection outcome in women with isolated polycystic ovaries or polycystic ovarian syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 2008; 277:239-244.
161. Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, et al. [Oocyte and embryo quality in polycystic ovary syndrome]. *Gynecol Obstet Fertil* 2003; 31:350-354.
162. Heijnen EM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Laven JS, Macklon NS, Fauser BC. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2006; 12:13-21.

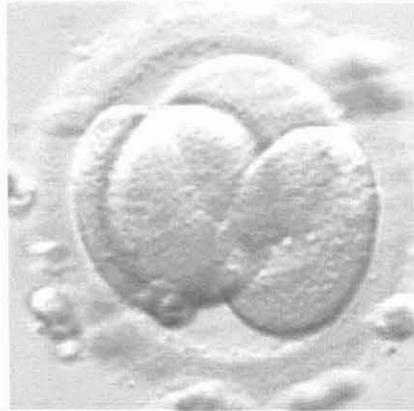
7. Annexes

7.1. Classification embryonnaire

7.2. Observation chronologique des embryons

7.3. Ovocytes dysmorphiques

TYPE I



TYPE II



TYPE III



10% FRAGMENTATION

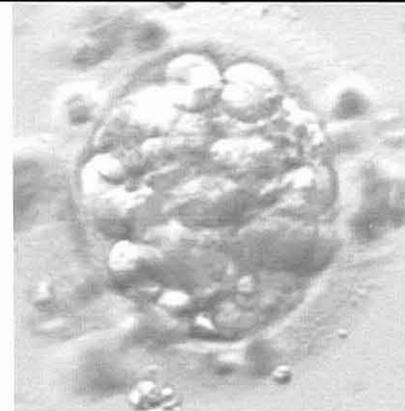


25% FRAGMENTATION



50% FRAGMENTATION

TYPE IV



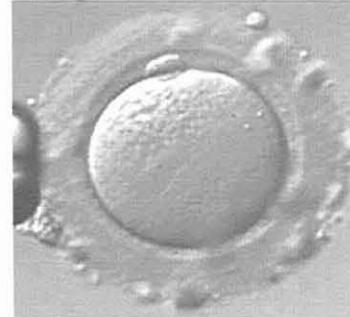
**ANNEXE I :
Classification embryonnaire**

ANNEXE II : Observation chronologique des embryons

J0 :
Jour de la
ponction



Ovocyte et sa corona radiata



Ovocyte décoronisé en métaphase II

J1 :



Ovocyte fécondé ou Zygote
diploïde

J2 :



Embryon typique à 4 cellules
sans fragment

J3 :



Embryon typique à 8 cellules
sans fragment

J4 :



Morula en début de compaction

J5 :



Jeune blastocyste

J6 :

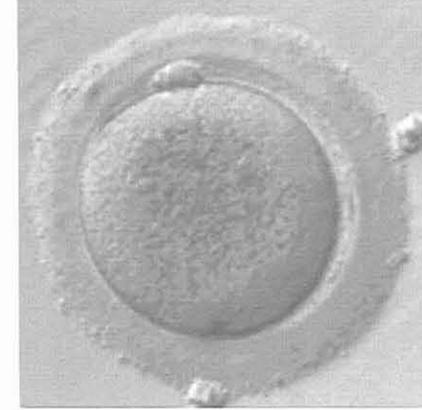
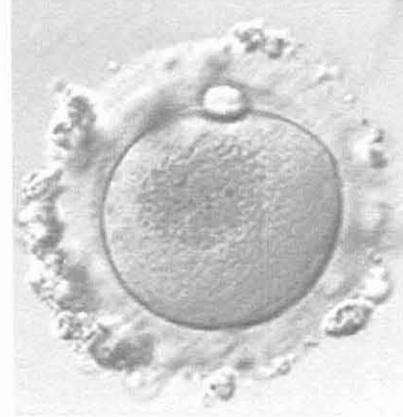
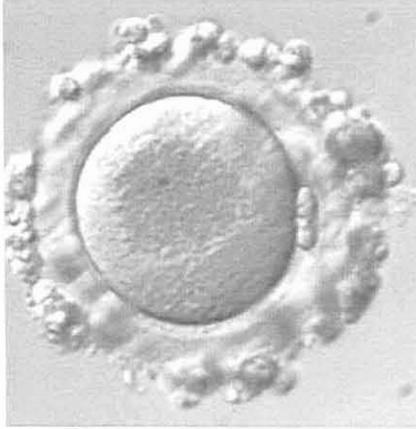


Blastocyste expansé

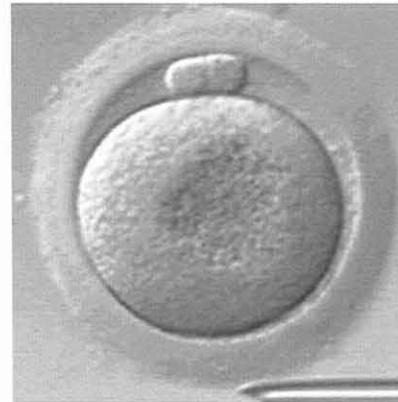
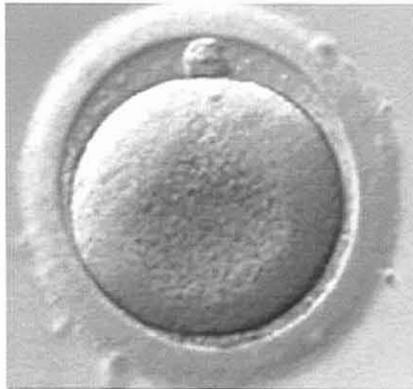


Blastocyste expansé

ANNEXE III : Dysmorphies ovocytaires (1)



Tache granuleuse centrale du cytoplasme : Aspect en « œil de bœuf »



Zone pellucide épaisse

Volumineux globule polaire

ANNEXE III : Dysmorphies ovocytaires (2)

Aspect post-mature :



Zone pellucide fine
Espace péri-vitellin augmenté
Débris de ZP dans l'espace péri-vitellin

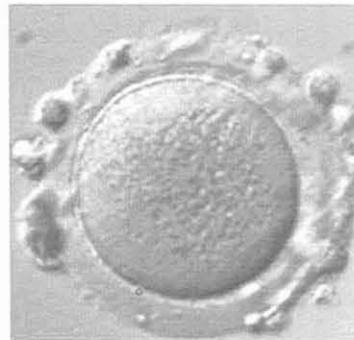


Globule polaire fragmenté
Espace péri-vitellin augmenté
Débris de ZP dans l'espace péri-vitellin
Aspect en « œil de bœuf »

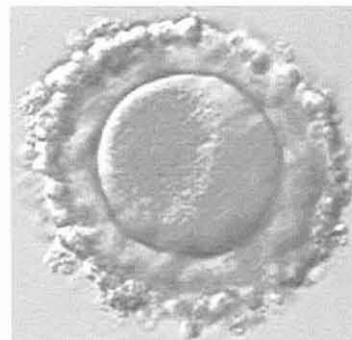


Débris de ZP dans l'espace péri-vitellin
Vacuoles intra-cytoplasmiques

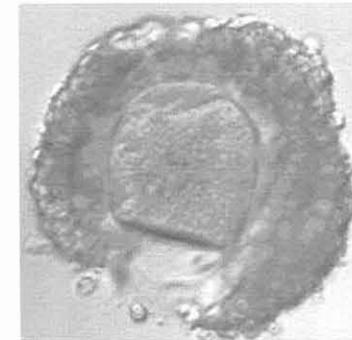
Aspect immature :



Ovocytes en Métaphase I, absence de GP
Espace péri-vitellin quasi-inexistant



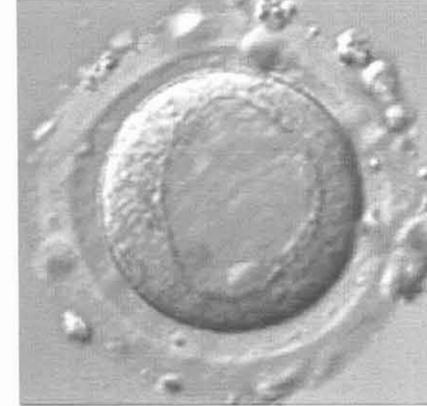
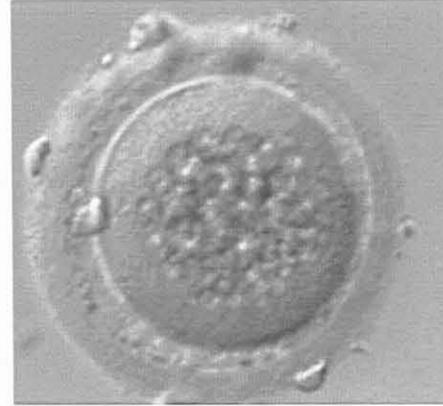
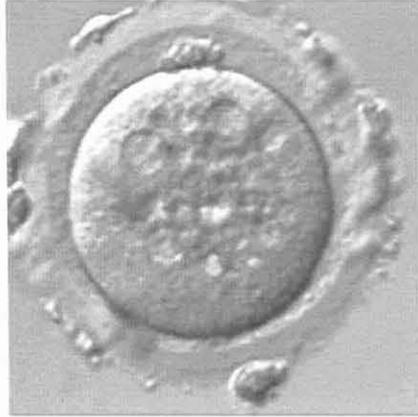
Corona radiata persistante
Absence de GP
Espace péri-vitellin quasi-inexistant



Corona radiata persistante, Absence de GP
Espace péri-vitellin quasi-inexistant

ANNEXE III : Dysmorphies ovocytaires (3)

Vacuoles ovocytaires:

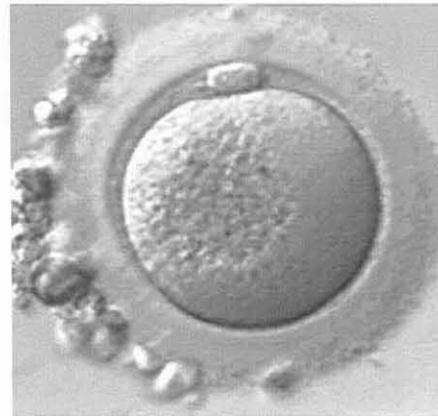


Ovocyte atrétique:



**Zone pellucide épaisse et sombre
Cytoplasme rétracté**

Zones pellucides épaisses:



VU

NANCY, le 22 septembre 2009
Le Président de Thèse

NANCY, le 24 septembre 2009
Le Doyen de la Faculté de Médecine

Professeur B. FOLIGUET

Professeur H. COUDANE

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE

NANCY, 29 septembre 2009

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY 1
Par délégation

Madame C. CAPDEVILLE-ATKISON

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Depuis sa découverte, l'essor de la FIV avec micro-injection intra-cytoplasmique du spermatozoïde (FIV-ICSI) est incontestable. La FIV-ICSI a transformé la prise en charge des infertilités, notamment masculines. En outrepassant les échecs de fécondation en FIV classique, la FIV-ICSI a permis une meilleure compréhension des mécanismes de fécondation.

Avec des taux de fécondation proches de 70% en ICSI, l'absence de remplacement embryonnaire est peu habituelle et d'autant plus problématique pour le couple et l'équipe d'AMP.

Nous avons étudié de façon rétrospective, de 2004 à 2008, 36 cas avec absence d'embryons ou obtention d'embryons de qualité insuffisante pour permettre un remplacement embryonnaire. Ces cas sont comparés à des témoins dont l'ICSI a permis un remplacement embryonnaire. L'âge maternel étant le facteur pronostic prépondérant dans la littérature, chaque cas a été apparié à deux témoins de même classe d'âge féminin.

Dans notre étude, la qualité et le nombre d'ovocytes sont déterminants pour le pronostic de l'ICSI. Les paramètres pronostiques retrouvés dans notre étude sont la réserve ovarienne reflétée par le taux de FSH au troisième jour du cycle, le taux d'œstradiol au moment du déclenchement de l'ovulation et la dose totale de gonadotrophines.

L'étude ne retrouve pas de différence significative entre cas et témoins concernant la fréquence du syndrome des ovaires micropolykystiques, de l'endométriose, tous stades confondus et de l'obésité.

Chez l'homme, ni l'âge ni les paramètres spermatiques tels qu'ils sont décrits dans la pratique quotidienne, ne sont significativement corrélés à l'absence de remplacement embryonnaire.

Cependant, l'étude révèle également qu'une attention moindre est apportée aux paramètres cliniques masculins. La proportion de fumeurs est supérieure chez les hommes par rapport aux femmes.

La littérature nous apprend également que l'amélioration des résultats de l'ICSI semble aussi passer par une meilleure sélection des gamètes comme le montre la recherche actuelle concernant l'analyse morphologique fine du spermatozoïde et de l'ovocyte, l'IMSI et l'activation ovocytaire. La biologie moléculaire, la cytogénétique et les nouvelles techniques comme la protéomique nous permettront peut-être de mieux cerner les patients à risque d'échec et seront peut-être à l'avenir les nouveaux alliés du praticien en AMP.

TITRE EN ANGLAIS: WHEN NO EMBRYO TRANSFER IS POSSIBLE IN ICSI: WHAT CAN WE SAY TO PATIENTS? RETROSPECTIVE STUDY AND LITERATURE REVIEW

THÈSE : MÉDECINE SPÉCIALISÉE – ANNÉE 2009.

MOTS CLEFS : (1) Remplacement embryonnaire, FIV-ICSI, facteurs pronostiques

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'U.F.R. :

**Faculté de Médecine de Nancy
9, avenue de la Forêt de Haye
54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex**