

Repro-toxicité : évaluation de l'impact de produits de bionettoyage sur les spermatozoïdes humains et développement d'un test in vitro, indicateur de repro-toxicité environnementale au laboratoire d'AMP

Nicolas Monnin

▶ **To cite this version:**

Nicolas Monnin. Repro-toxicité : évaluation de l'impact de produits de bionettoyage sur les spermatozoïdes humains et développement d'un test in vitro, indicateur de repro-toxicité environnementale au laboratoire d'AMP. Sciences pharmaceutiques. 2017. hal-01931938

HAL Id: hal-01931938

https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01931938

Submitted on 23 Nov 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-thesesexercice-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

UNIVERSITE DE LORRAINE
2017

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 27 octobre 2017

Par **Nicolas MONNIN**
né le 28 Septembre 1990 à Nancy (54)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

Repro-toxicité : évaluation de l'impact de produits de bionettoyage sur les spermatozoïdes humains, et développement d'un test *in vitro*, indicateur de repro-toxicité environnementale au laboratoire d'AMP

Membres du Jury

Président :	Mme le Professeur BENSOUSSAN Danièle,	PU-PH
Juges :	Mme le Docteur KOSCINSKI Isabelle,	MCU-PH (Directeur)
	Mme le Professeur FRYDMAN Nelly,	PU-PH
	Mr le Professeur JOUZEAU Jean-Yves,	PU-PH
	Mme le Docteur DILIGENT Catherine	PH
	Mr le Docteur FLORENTIN Arnaud	PHU

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2016-2017

DOYEN
Francine PAULUS
Vice-Doyen
Béatrice FAIVRE
Directeur des Etudes
Virginie PICHON
Conseil de la Pédagogie
Président, Brigitte LEININGER-MULLER
Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier
Président, Béatrice DEMORE
Commission Prospective Facultaire
Président, Christophe GANTZER
Vice-Président, Jean-Louis MERLIN
Commission de la Recherche
Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine	Béatrice FAIVRE
Responsables de la filière Industrie	Isabelle LARTAUD, Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable de la filière Hôpital	Béatrice DEMORE
Responsable Pharma Plus ENSIC	Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable Pharma Plus ENSAIA	Raphaël DUVAL
Responsable Pharma Plus ENSGSI	Igor CLAROT
Responsable de la Communication	Marie-Paule SAUDER
Responsable de la Cellule de Formation Continue et individuelle	Béatrice FAIVRE
Responsable de la Commission d'agrément des maîtres de stage	Béatrice FAIVRE
Responsable ERASMUS	Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES
Chantal FINANCE
Claude VIGNERON
PROFESSEURS EMERITES
Jeffrey ATKINSON
Jean-Claude BLOCK
Max HENRY
Alain MARSURA ¤
Claude VIGNERON
PROFESSEURS HONORAIRES
Roger BONALY
Pierre DIXNEUF
Marie-Madeleine GALTEAU
Thérèse GIRARD
Michel JACQUE
Pierre LABRUDE
Vincent LOPPINET
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES
Monique ALBERT
Mariette BEAUD
Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Francine KEDZIEREWICZ
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Jean-Louis MONAL
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Christine PERDICAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Gabriel TROCKLE
Maria WELLMAN-ROUSSEAU
Colette ZINUTTI

ENSEIGNANTS	*Section CNU**	*Discipline d'enseignement*

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	*82*	*Thérapie cellulaire*
Jean-Louis MERLIN	*82*	*Biologie cellulaire*
Alain NICOLAS	*80*	*Chimie analytique et Bromatologie*
Jean-Michel SIMON	*81*	*Economie de la santé, Législation pharmaceutique*
Nathalie THILLY	*81*	*Santé publique et Epidémiologie*

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	*86*	*Pharmacologie*
Igor CLAROT ¤	*85*	*Chimie analytique*
Joël DUCOURNEAU	*85*	*Biophysique, Acoustique, Audioprothèse*
Raphaël DUVAL	*87*	*Microbiologie clinique*
Béatrice FAIVRE	*87*	*Biologie cellulaire, Hématologie*
Luc FERRARI	*86*	*Toxicologie*
Pascale FRIANT-MICHEL	*85*	*Mathématiques, Physique*
Christophe GANTZER	*87*	*Microbiologie*
Frédéric JORAND	*87*	*Eau, Santé, Environnement*
Isabelle LARTAUD	*86*	*Pharmacologie*
Dominique LAURAIN-MATTAR	*86*	*Pharmacognosie*
Brigitte LEININGER-MULLER	*87*	*Biochimie*
Pierre LEROY	*85*	*Chimie physique*
Philippe MAINCENT	*85*	*Pharmacie galénique*
Patrick MENU	*86*	*Physiologie*
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	*86*	*Chimie thérapeutique*
Bertrand RIHN	*87*	*Biochimie, Biologie moléculaire*

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	*81*	*Pharmacie clinique*
Alexandre HARLE ¤	*82*	*Biologie cellulaire oncologique*
Julien PERRIN	*82*	*Hématologie biologique*
Marie SOCHA	*81*	*Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique*

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	*87*	*Parasitologie*
Xavier BELLANGER	*87*	*Parasitologie, Mycologie médicale*
Emmanuelle BENOIT	*86*	*Communication et Santé*
Isabelle BERTRAND	*87*	*Microbiologie*
Michel BOISBRUN	*86*	*Chimie thérapeutique*
François BONNEAUX	*86*	*Chimie thérapeutique*
Ariane BOUDIER	*85*	*Chimie Physique*
Cédric BOURA	*86*	*Physiologie*
Joël COULON	*87*	*Biochimie*
Sébastien DADE	*85*	*Bio-informatique*
Dominique DECOLIN	*85*	*Chimie analytique*
Roudayna DIAB	*85*	*Pharmacie galénique*
Natacha DREUMONT	*87*	*Biochimie générale, Biochimie clinique*
Florence DUMARCAY	*86*	*Chimie thérapeutique*
François DUPUIS	*86*	*Pharmacologie*
Adil FAIZ	*85*	*Biophysique, Acoustique*
Anthony GANDIN	*87*	*Mycologie, Botanique*
Caroline GAUCHER	*86*	*Chimie physique, Pharmacologie*
Stéphane GIBAUD	*86*	*Pharmacie clinique*
Thierry HUMBERT	*86*	*Chimie organique*
Olivier JOUBERT	*86*	*Toxicologie, Sécurité sanitaire*

ENSEIGNANTS (suite)	*Section CNU**	*Discipline d'enseignement*
Alexandrine LAMBERT	*85*	*Informatique, Biostatistiques*
Julie LEONHARD	*86/01*	*Droit en Santé*
Christophe MERLIN	*87*	*Microbiologie environnementale*
Maxime MOURER	*86*	*Chimie organique*
Coumba NDIAYE	*86*	*Epidémiologie et Santé publique*
Marianne PARENT ⌑	*85*	*Pharmacie galénique*
Francine PAULUS	*85*	*Informatique*
Caroline PERRIN-SARRADO	*86*	*Pharmacologie*
Virginie PICHON	*85*	*Biophysique*
Sophie PINEL	*85*	*Informatique en Santé (e-santé)*
Anne SAPIN-MINET	*85*	*Pharmacie galénique*
Marie-Paule SAUDER	*87*	*Mycologie, Botanique*
Guillaume SAUTREY	*85*	*Chimie analytique*
Rosella SPINA	*86*	*Pharmacognosie*
Sabrina TOUCHET ⌑	*86*	*Pharmacochimie*
Mihayl VARBANOV	*87*	*Immuno-Virologie*
Marie-Noëlle VAULTIER	*87*	*Mycologie, Botanique*
Emilie VELOT	*86*	*Physiologie-Physiopathologie humaines*
Mohamed ZAIOU	*87*	*Biochimie et Biologie moléculaire*
PROFESSEUR ASSOCIE		
Anne MAHEUT-BOSSER	*86*	*Sémiologie*
PROFESSEUR AGREGE		
Christophe COCHAUD	*11*	*Anglais*

⌑ *En attente de nomination*

**Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D' exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N’ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

À Madame le Professeur Danièle Bensoussan,
Pour avoir accepté la présidence de ce jury de thèse, pour votre enseignement à la Faculté que j'ai tant apprécié, pour votre gentillesse et votre disponibilité, soyez assurée de mon grand respect et de ma profonde reconnaissance.

À Madame le Docteur Isabelle Koscinski,
Pour avoir accepté la direction de cette thèse et pour votre soutien dans ce projet, pour votre incroyable dynamisme et pour votre bonne humeur de tous les jours, je vous remercie sincèrement de m'avoir accompagné durant ce parcours.

À Madame le Professeur Nelly Frydman,
Pour avoir accepté de juger ce travail de thèse, pour ta gentillesse et ton accueil chaleureux lors de ma venue à Paris, pour toutes les connaissances que tu m'as transmises et pour tes conseils, sache que ce semestre parisien restera pour moi une des plus belles expériences de mon internat.

À Monsieur le Professeur Jean-Yves Jouzeau,
Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail de thèse, pour vos enseignements lors de mes années à la Faculté de Nancy qui ont confirmé ma volonté de devenir biologiste médical, pour vos connaissances guitaristiques et pour votre bienveillance, soyez assuré de mon profond respect.

À Madame le Docteur Catherine Diligent,
Pour ton soutien quotidien depuis le début de ce long travail, pour ta gentillesse et ton professionnalisme, je te remercie sincèrement de m'avoir permis de continuer à travailler à tes côtés au service de Biologie de la Reproduction de la Maternité de Nancy.

À Monsieur le Docteur Arnaud Florentin,
Pour ton aide indispensable à la réalisation de ce travail expérimental, pour tes conseils avisés, pour ta bonne humeur et ta sympathie, sois assuré de ma profonde gratitude.

À Messieurs les Docteurs Jacques Criquelion et Gaëtan Rauwel des laboratoires ANIOS,
Ce travail n'aurait pas été possible sans vous et je vous remercie tout particulièrement pour votre soutien et pour votre disponibilité.

À toutes les personnes qui ont marqué mon parcours d'interne…

Aux membres du service de Biologie de la Reproduction du CHRU de Nancy pour leur bonne humeur, et tous ces moments de rire, d'amitié et bien sûr de travail : **Christelle**, **Marie-Odile**, **Coco**, **Laure**, **Christel**, **Sabrina**, **Brigitte**, **Florence**, **Songül**, **Sylvie** et **Camale**. C'est un plaisir quotidien de venir travailler à vos côtés.

Aux belles personnes rencontrées lors de mon expérience parisienne,
À l'équipe du centre d'AMP de l'hôpital Antoine Béclère de Clamart, avec qui j'ai tant appris… Laëtitia, Anne, Stéphane, Ilan, Cathie, Blandine, Christine, Justine, Benoit, Valérie, Sophie, Mylène, Dominique, Alexandra, mon ancien co-interne Alex (hommage spécial à nos dégustations de café et à tes répliques cultes façon « Judge Dredd » !), sans oublier Ursula, Laura et Ahmed mes co-internes gynéco. Pour votre gentillesse et votre accueil, ce semestre restera pour moi un impérissable souvenir heureux.

Je saisis l'occasion qui m'est donnée de remercier l'ensemble des professionnels de santé, pharmaciens, médecins, biologistes, techniciens de laboratoire, infirmières ou sages-femmes, qui m'ont transmis leur savoir et m'ont accompagné lors des différentes étapes de ce parcours, avec une pensée particulière pour les Docteurs **Michèle Martin**, **Julien Perrin** et **Brigitte Dousset**. Je n'oublie pas non plus **Chantal** (bienveillante et présente pour tous les internes de biologie médicale), **Karima et Soumeya** (duo infernal du P2U !), **Gaël** (pour ton professionnalisme et ta gentillesse), **Hélène** (merci d'être toujours à mes côtés depuis mon début d'internat) et **Léonie** (merci pour ton aide lors de mes manip' de thèse, sans toi tout aurait été plus difficile).

Aux belles rencontres de l'internat…

Je remercie tous mes amis et co-internes qui ont rendu ces quatre années d'internat inoubliables. *Je remercie tout d'abord **Xavier** et **Morgane** qui ont fait de ma période de FFI aux essais cliniques un excellent souvenir (merci pour ces bons moments et pour votre amitié sincère). Merci à **Christine**, **Christelle** et **Pierre** (pour ce splendide début d'internat en bactério puis en hémato), **Julien** (mon fils spirituel !), **Clément** (mon ptit Keb's, ce semestre en Bioch' a tout simplement été magique grâce à ta connaissance de Blobby volley ball et des hémoglobines glyquées), **Clémence** et **Lucie** (les parasitologues en herbe !), **Marion** et **Antoine** (pour ce super semestre en génétique), **Chloé** (ma gynéco préférée !) et **Charles** (pour finir en beauté !). Merci également à **Alain** et **Anaëlle** (pour ces répét' au top et ce petit concert qui restera dans ma mémoire), **Lolo** et **Lulu** (grosse pensée pour ce chaleureux nouvel an), **Lulu** (et tes expressions de folie !), **Benoit** et **Delphine** (pour toutes ces soirées partagées) et tous les autres.*

À mes amis parisiens ou d'ailleurs, rencontrés lors du master 2 de Paris Descartes : Mehdi, Momo, Mimi, Julie et Marion,
Chaque séminaire de cours a été l'occasion de nous retrouver et une véritable amitié en est née. Pour ces soirées parisiennes, ces délires, ces discussions dans tous les sens… merci d'être vous !

Merci également à **Mike**, sans qui mon semestre à Paris n'aurait pas été aussi sympa, merci mon poto pour ta présence et ta générosité.

Je tiens à remercier plus particulièrement **Brieuc**,
Pour notre collaboration en tant que représentants des internes bio et le plaisir de travailler à tes côtés, pour ta sagesse et le profond respect que tu m'inspires, et tout simplement pour nos nombreux moments d'amitié, primordiaux à mes yeux.

Enfin, je remercie sincèrement **Julien**,
Pour nos échanges de connaissances dans tous les domaines y compris le karaté, pour ton soutien inestimable dans les moments difficiles, pour ton grand cœur et pour notre authentique amitié.

À mon « noyau dur » depuis la Faculté…

À Alex,
Depuis le tutorat de la Faculté, en passant par Djerba, ou encore toutes ces magnifiques randonnées où tu m'as fait découvrir le plaisir de la marche en montagne… que d'aventures ! Notre amitié perdurera et je remercie la Faculté pour nous avoir permis de nous rencontrer.

À Doudou,
Entre les parties de badminton endiablées, nos discussions intenses sans compter les heures et tous ces moments de rire et de gastronomie (je n'oublierai jamais le goût exquis de ta tarte au citron meringuée !), tu as été un pilier essentiel dans mon parcours. Merci pour tous ces bons moments mais aussi pour tous ceux à venir.

À Lolo,
Mon Lolo, je ne te remercierai jamais assez de tous ces moments uniques qu'on a pu partager pendant ces années Fac… Les fous rires, les Mex'Illico, les soirées jeux, les sessions SoundCloud, le soutien mutuel pour le concours de l'internat et la liste est encore bien longue… Merci d'être toujours là aujourd'hui, ton amitié est pour moi indispensable.

Je remercie également **Mathilde**, **Paul**, **Claire**, **Céline** et **Élodie** qui ont fait de ces années Fac un rayon de soleil et des moments de bonheur auxquels je repense bien souvent.

À mes amis de toujours, présents depuis si longtemps…

À Yannick,
Pour nos nombreuses discussions et réflexions à tous les âges de notre vie, pour notre solide amitié malgré la distance qui nous a parfois séparé de plusieurs milliers de kilomètres, sois remercié pour ta présence essentielle à mes yeux.

À Léopold,
Sans aucun doute mon premier ami, souviens-toi de cette première section de maternel… depuis nos jeunes années jusqu'à maintenant tu as toujours énormément compté, je te remercie sincèrement pour ton amitié.

À Alexis,
Depuis le Collège et ton divin toucher de volant au badminton, je ne compte plus les souvenirs partagés… DJ cheddar et les soirées « où il y a toujours à boire », les sessions geek, les vacances à Cagnes-sur-mer et les fous rires sans cesse… Merci d'être à mes côtés depuis tout ce temps.

À Ghislain,
Mon Diddy… que dire sans écrire un roman… je ne te remercierai jamais assez pour tous ces moments vécus ensemble, avec notamment nos fameux bongos, ces instants musicaux aussi riches que nombreux, ton grand cœur, ton sens de l'amitié, ta présence et ton humour.

À Oranne,
Entre la France et la Belgique, Benney et Liège, j'ai vécu les grandes heures de « Nanou the frite » ! Quel plaisir de rire avec toi et parallèlement quel réconfort de pouvoir compter sur toi à tout instant… Sache que ton écoute attentive, ton intelligence et ta douce voix au micro du groupe de Villers m'ont toujours apporté beaucoup d'apaisement.

À Olivier,
Depuis ce lasermax où tu m'as vendu du rêve, que de soirées, nouvel an, matchs de hand (big up à ta magnifique roucoulette), restaurants etc. Tu mérites le meilleur mon bon Oulive et je suis vraiment ravi que l'île de beauté t'offre la promesse d'un avenir radieux.

À Xavier P,
Depuis ce fameux concert de Toto sous l'égide de notre maître Andréas, merci pour tous ces « jams » guitaristiques, ces nombreux moments d'amitié partagés et ceux à venir…

À ma famille,

À mes parents,
Pour votre amour, votre présence et votre soutien de tous les jours. Aucun remerciement ne sera jamais à la hauteur de ce que vous m'apportez. Maman, merci pour ton dévouement, pour ta douceur ainsi que pour la sérénité ressentie à chaque moment partagé. Papa, sache que devenir un jour un père comme celui que tu es, représenterait pour moi la plus belle des réussites.

À Pierre mon frère,
Que de bonheur vécu ensemble depuis tant d'années… merci pour ta joie de vivre et merci d'être un petit frère si présent dans ma vie.

À Mamie,
Pour ton amour, ton soutien et pour tous ces instants partagés en famille, avec une pensée particulière pour ces Noëls à Jarville… ils resteront éternellement dans ma mémoire. Je n'aurais pu rêver avoir une grand-mère si parfaite.

À Sylvie ma marraine,
Des après-midis de mon enfance à regarder « les 101 Dalmatiens », en passant par ce somptueux séjour ensemble à la Guadeloupe, tu as toujours veillé sur moi avec douceur et bienveillance. Merci d'avoir été une si bonne fée pour moi et merci pour ta présence permanente, si importante à mes yeux.

À Romain mon parrain, Magaly, Victorine et Eugénie ma filleule,
Pour votre soutien et pour votre affection, c'est toujours un grand plaisir de venir vous retrouver en Bretagne.

À l'ensemble de ma famille, oncles et tantes, cousins et cousines, sans oublier Nicole, Jean-Guy, Murielle et Ophélie,
Pour tous ces moments partagés et ceux encore à venir.

À Vincent,
Tu as compté, tu comptes et tu compteras toujours comme un frère pour moi. Ta présence dans les bons comme dans les mauvais moments m'a toujours été essentielle. Merci pour ces innombrables souvenirs et merci pour tous les instants de vie que nous partagerons encore dans l'avenir.

À Marie-Cécile, Patrick, Agathe, Julien, Angéline, Amélie et Florent,
Pour votre chaleureux accueil à chaque séjour auvergnat, pour votre affection et votre soutien, pour l'immense plaisir d'être aujourd'hui le parrain d'Angéline, et tout simplement, pour chaque moment partagé avec vous, en famille.

À ma douce Caroline,

Aucun mot de la langue de Molière n'est assez fort pour exprimer mes sentiments à ton égard. Ton soutien réconfortant, ton regard plein de lumière et ton amour ont fait de ma vie un véritable paradis. De notre rencontre à Nancy jusqu'aux rivages de Bellagio, que de bonheur partagé… et bientôt, sur le parvis du château des Martinanches, que de bonheur à venir…

À la mémoire de ma grand-mère Marcelle, de mon grand-père Michel et de mon grand-père Georges.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES **4**

TABLE DES TABLEAUX **6**

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES **7**

PARTIE I : CONTEXTE GÉNÉRAL **8**

I Tests de repro-toxicité et AMP **11**

I.1. La repro-toxicité et ses méthodes d'évaluation 11

I.2. Tests d'origine murine 12

I.2.1. « Follicle BioAssay » (FBA) 12

I.2.2. « In Vitro Fertilization assay » (IVF) 16

I.2.3. « Mouse Embryo Assay » (MEA) 16

I.2.4. « Embryo implantation assay » 18

I.2.5. « Embryonic Stem cell Test » (EST) 18

I.2.6. « Hybridoma cells » 20

I.3. Autres tests d'origine animal 21

I.3.1. Tests effectués avec des lapins 21

I.3.2. Tests effectués avec des hamsters 22

I.3.2.a. « Hamster sperm motility test » 22

I.3.2.b. « Oocyte comet assay » 23

I.3.2.c. Test sur lignée cellulaire CHO KI 24

I.3.3. Tests effectués avec des bovins 24

I.3.3.a. « Bull sperm motility test » 24

I.3.3.b. « Bovine hemizona assay » 25

I.4. « Human Sperm Survival Assay » (HSSA) ou « Sperm Survival Test » (SpST) 26

I.5. Tests en développement 29

I.6. Produits testés lors des tests de repro-toxicité en AMP 29

I.7. Synthèse des tests utilisés en AMP 32

II Les produits de bionettoyage au laboratoire d'AMP **36**

II.1. Généralités sur les produits de désinfection 36

II.1.1. Réglementation et définitions générales 36

II.1.2. Choix d'un produit de bionettoyage 36

II.2. Produits de bionettoyage et AMP 37

II.3. Enquête BLEFCO 37

III Généralités sur les Composés Organiques Volatils (COV) **44**

III.1. Définition 44

III.1.1. Familles chimiques et sources d'émission 44

III.1.2. Études toxicologiques 46

III.1.2.a. Action toxique indirecte 46

III.1.2.b. Action toxique directe 47

III.2. Méthodes de dosage 48

III.3. Origine des COV au laboratoire d'AMP 49

III.4. Impact des COV sur les gamètes et les embryons humains 51

III.4.1. Mécanisme d'action 51

III.4.2. Données de la littérature 51

III.4.2.a. Études montrant un intérêt à améliorer la qualité de l'air au laboratoire d'AMP 52
III.4.2.b. Études mettant en cause l'intérêt d'un air filtré au laboratoire d'AMP 54
III.4.2.c. Conclusions et points à prendre en compte 54
III.5. Méthodes pour limiter le taux en COV 55
III.5.1. Systèmes de filtration 56
III.5.2. Méthode UVPCO 56
III.5.3. Système de co-culture 57
III.5.4. Choix des produits utilisés au laboratoire et protocoles de bionettoyage 57
PARTIE II : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE 58
I Validation du mode opératoire : étude préalable témoin positif 59
I.1. Choix des prélèvements spermatiques et qualification 59
I.2. Mise en place de l'incubation 60
I.3. Résultats 61
I.4. Discussion 61
II Étude BIONETTOX-FIV 62
II.1. Objectifs de l'étude 62
II.1.1. Objectif principal 62
II.1.2. Objectifs secondaires 62
II.2. Matériels et méthodes 62
II.2.1. Prélèvements de sperme utilisés et consentements 62
II.2.2. Produits de bionettoyage testés 63
II.2.3. Mode opératoire 63
II.2.3.a. Validation des spermes à utiliser 63
II.2.3.a.i. Mobilité spermatique 64
II.2.3.a.ii. Vitalité spermatique 65
II.2.3.a.iii. Numération spermatique 66
II.2.3.b. Expérimentation 68
II.2.3.c. Analyses spermatiques réalisées après 24h d'incubation 70
II.2.3.c.i. Description des analyses et calcul des SpST index 70
II.2.3.c.ii. Analyse statistique des résultats 71
II.2.3.d. Explorations chimiques évaluant un potentiel dégagement de COV 71
II.2.3.d.i. Mesure du taux de COV total 71
II.2.3.d.ii. Mesure du Carbone Organique Total (COT) 72
II.2.3.d.iii. SCAN COV 73
II.3. Résultats 75
II.3.1. Analyses spermatiques 75
II.3.1.a. Étuves « TEST Conditions N » conditions normales d'utilisation 76
II.3.1.b. Étuves « TEST Conditions E » conditions exagérées (atmosphères saturées) 78
II.3.2. Mesures du taux de COV total 79
II.3.3. Mesures du COT 80
II.3.4. SCAN COV 80
II.3.4.a. Tube témoin blanc 80
II.3.4.b. Tubes étuves produit A, produit B et témoin négatif 81
DISCUSSION 84
CONCLUSION 89
REFERENCES 90

ANNEXES **100**
I Annexe I **101**
II Annexe II **105**
III Annexe III **106**
IV Annexe IV **107**

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Facteurs chimiques et physiques pouvant affecter le développement embryonnaire *in vitro* (3) 8
Figure 2 : Techniques d'évaluation de la repro-toxicité en AMP (d'après Nijs *et al.* (18)) 11
Figure 3 : Rappel sur la structure du follicule tertiaire (illustration du site www.embryology.ch) 13
Figure 4 : Évolution morphologique du follicule au cours du FBA (29)..... 13
Figure 5 : Paramètres évalués au cours du FBA et périodes d'exposition à la substance testée (30)..... 14
Figure 6 : Maturation nucléaire ovocytaire après stimulation hormonale (27) 15
Figure 7 : Aspect morphologique des follicules pré-antraux murins en fonction de l'exposition à l'ARIMIDEX® (32)..... 15
Figure 8 : Images représentatives de blastocystes à J6 de la culture (38)..... 17
Figure 9 : Origine et devenir des cellules souches embryonnaires (d'après Servier Medical Art) 19
Figure 10 : Aperçu global du test sur cellules souches embryonnaires murines ES-D3 (25).. 20
Figure 11 : Cellules murines d'hybridome 1E6 (53)..... 21
Figure 12 : Viabilité et état acrosomal des spermatozoïdes bovins cryoconservés Biociphos® décongelés, tels que déterminés par Hoechst 33258 et PSA-FITC (61)..... 25
Figure 13 : Sources des Composés Organiques Volatils (COV) (chiffres utilisés : www.citepa.org)..... 46
Figure 14 : COV détectés dans une bonbonne de CO2 utilisée pour les incubateurs des laboratoires d'AMP (d'après (86)) 50
Figure 15 : Chronologie et étapes préliminaires de l'étude BIONETTOX-FIV 58
Figure 16 : Répartition des spermes et milieux de culture dans les boites NUNC - étude préliminaire témoin positif..... 60
Figure 17 : Description de la cellule de Thoma..... 67
Figure 18 : Règles de comptage lors de l'utilisation de la cellule de Thoma..... 67
Figure 19 : Répartition des spermes et milieux de culture dans les boites NUNC - étude BIONETTOX-FIV..... 69
Figure 20 : ppbRAE3000 (RAE SYSTEMS) 72
Figure 21 : Mode opératoire pour analyse COT 72
Figure 22 : Analyseur TOC-L de Shimadzu (source : http ://www.shimadzu.fr)..... 73
Figure 23 : Schéma du principe de l'analyse NPOC (source : http://www.shimadzu.fr) 73
Figure 24 : Mode opératoire pour prélèvement d'air en vue d'un screening des COV 74
Figure 25 : Thermodésorbeur couplé CPG-SM - LERES Rennes..... 75
Figure 26 : Résultats SpST index étuves TEST Conditions N (sans huile)..... 76
Figure 27 : Résultats SpST index étuves TEST Conditions N (avec huile) 77
Figure 28 : Résultats SpST index étuves TEST Conditions E (sans huile) 78
Figure 29 : Résultats SpST index étuves TEST Conditions E (avec huile)..... 78
Figure 30 : Pièce des étuves (laboratoire DHREAS - Faculté de Médecine de Nancy)..... 86
Figure 31 : Synthèse du mode opératoire de l'étude BIONETTOX-FIV 105

Figure 32 : Spectre du tube témoin blanc obtenu suite à l’analyse SCAN-COV effectuée au LERES – Rennes..... 107

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Produits testés par test SpST par Nijs *et al.* (d'après (18)) 30
Tableau 2 : Caractéristiques des principaux tests de repro-toxicité utilisés en AMP 32
Tableau 3 : État des lieux des pratiques de bionettoyage dans les centres d'AMP de France et à Bruxelles 38
Tableau 4 : Valeurs normales du spermogramme (source : site OMS http://www.who.int/fr/) 59
Tableau 5 : Synthèse des résultats de l'étude préliminaire témoin positif 61
Tableau 6 : Critères d'évaluation de la mobilité spermatique 64
Tableau 7 : Différence de pourcentage acceptable selon la moyenne (référence : OMS 2010) 65
Tableau 8 : Dilution à effectuer en fonction du nombre de spermatozoïdes observés à l'état frais 66
Tableau 9 : Nombre de lignes à compter sur la cellule de Thoma lors de la numération spermatique 67
Tableau 10 : Différence acceptable entre les deux comptes de spermatozoïdes en fonction de la somme des deux comptes de spermatozoïdes 68
Tableau 11 : SpST index - étude BIONETTOX-FIV 76
Tableau 12 : Synthèse des mesures du taux de COV total (VOC-mètre ppbRAE3000) 79
Tableau 13 : Résultats des mesures de COT (NPOC) 80
Tableau 14 : COV présents dans la tube témoin blanc (SCAN COV - LERES Rennes) 81
Tableau 15 : Tableau global des résultats SCAN COV (partie 1/2) 82
Tableau 16 : Tableau global des résultats SCAN COV (partie 2/2) 83
Tableau 17 : Publications étudiant l'impact de la qualité de l'air au laboratoire d'AMP 101
Tableau 18 : Exemple de feuille de travail – étude BIONETTOX-FIV (ici celle de l'expérimentation n°3) 106

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

AOS : Aérosols Organiques Secondaires
AMP : Assistance Médicale à la Procréation
ASRM : American Society for Reproductive Medicine
BLEFCO : Biologistes des Laboratoires d'Étude de la Fécondation et de la Conservation de l'œuf
COT : Carbone Organique Total
COV : Composé(s) Organique(s) Volatile(s)
CPG-DIF : Chromatographie en Phase Gazeuse – Détecteur à Ionisation de Flamme
CPG-SM : Chromatographie en Phase Gazeuse – Spectrométrie de Masse
DHREAS : Département d'Hygiène, des Risques Environnementaux et Associés aux Soins
DRI : Direction de la Recherche clinique et de l'Innovation
EHESP : École des Hautes Études en Santé Publique
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
ESHRE : European Society of Human Reproduction and Embryology
EST : Embryonic Stem cell Test
FBA : Follicle BioAssay
FDS : Fiche De Sécurité
FH : Ferticult Hepes®
FIV : Fécondation In Vitro
HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HEPA : High Efficiency Particulate Air (filtration)
HSSA : Human Sperm Survival Assay
IC : Inorganic Carbon (Carbone Inorganique)
IIU : Insémination Intra-Utérine
IVF : In Vitro Fertilization
LERES : Laboratoire d'Étude et de Recherche en Environnement et Santé
MEA : Mouse Embryo Assay
NDIR : Non-Dispersive Infra Red (Infra Rouge Non Dispersif)
NPOC : Non Purgeable Organic Carbon (Carbone Organique Non Purgeable)
POC : Purgeable Organic Carbon (Carbone Organique Purgeable)
PSM : Poste de Sécurité Microbiologique
RMF : Reverse Match Factor
SCSA : Sperm Chromatin Structure Assay
SpST : Sperm Survival Test
UP : Ultra Pure (eau)
UVPCO : UltraViolet PhotoCatalytic Oxidation

PARTIE I : CONTEXTE GÉNÉRAL

C'est en 1978 que Louise Brown voit le jour au Royaume-Uni. Elle est le premier enfant né après une Fécondation *In Vitro* (FIV) grâce à l'étroite collaboration entre le Docteur Robert Edwards (prix Nobel de médecine en 2010) et le Docteur Patrick Streptoe (1,2). Depuis, l'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) a connu un essor particulièrement important. A l'heure actuelle, plus de cinq millions d'enfants sont nés grâce à cette spécialité médicale relativement nouvelle (2,3). De nombreux progrès ont été réalisés permettant d'améliorer les taux d'implantation embryonnaire et de grossesse. Cependant, d'autres avancées scientifiques sont encore souhaitées afin d'augmenter les taux de réussite et de diminuer le nombre de cycles d'AMP nécessaires pour obtenir une grossesse et par la suite un enfant en bonne santé (3).

In vitro, l'embryon est soumis à des conditions très différentes des conditions *in vivo* et est ainsi affecté par différents facteurs, sources de stress (3). A titre d'exemple, *in vivo* après la fécondation et les prémices du développement embryonnaire, l'embryon est exposé à un environnement hormonal, nutritif et cytokinique variant de manière très importante lors de sa progression des trompes de Fallope en direction de la muqueuse utérine (4). À l'inverse, *in vitro*, l'embryon reste statique et en contact avec une quantité importante de milieu de culture de composition invariante, et dans lequel les substances issues du métabolisme embryonnaire stagnent jusqu'au changement éventuel de milieu ou au replacement de l'embryon dans l'utérus (3). Par ailleurs, la simple manipulation de l'ovocyte ou de l'embryon par pipettage peut induire un stress délétère à son développement si cette opération est réalisée trop brutalement (par l'activation de voies de phosphorylation) (5). Wale et Gardner ont résumé dans la figure ci-après l'ensemble des facteurs physiques et chimiques pouvant être délétères *in vitro* pour l'embryon (3).

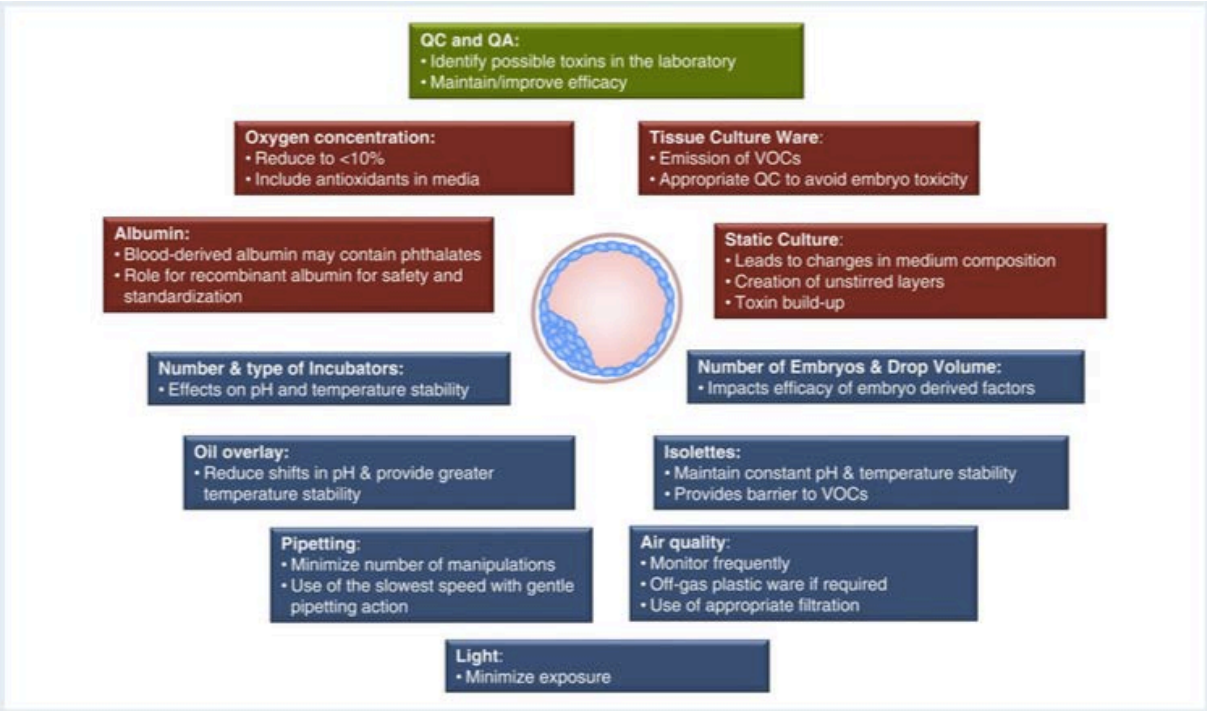


Figure 1 : Facteurs chimiques et physiques pouvant affecter le développement embryonnaire *in vitro* (3)

Une synergie d'action négative semble exister si ces différents éléments de stress embryonnaire sont associés (2,3). Devant de si nombreuses sources d'altération du développement embryonnaire, un maximum d'efforts doit être effectué pour rendre la culture *in vitro* la moins néfaste possible, et ceci même si l'embryon est rapidement transféré au stade clivé au troisième jour (J3). En effet, Wale et Gardner soulignent que la réponse embryonnaire au stress est finalement la plus importante dans les premiers stades du développement embryonnaire, c'est-à-dire avant le stade blastocyste à J5, l'embryon étant plus vulnérable avant le phénomène de compaction (3). Par ailleurs, la culture prolongée présente aujourd'hui un véritable intérêt dans le cadre de l'amélioration des taux de réussite en FIV, mais il est légitime de s'interroger sur un lien potentiel entre cette culture longue et la survenue ultérieure de pathologies potentiellement graves. Scherrer *et al*. décrivent ainsi le développement de maladies vasculaires chez les enfants conçus par FIV (6). Pour certains auteurs comme Quinn *et al*., les conditions de culture *in vitro* ne pourront jamais imiter pleinement le développement *in vivo* (7). Les auteurs rappellent que le principal objectif d'un système de culture adéquat est d'assurer un développement embryonnaire correct, permettant de sélectionner les embryons dotés du meilleur potentiel de développement (7). C'est ainsi que le système de culture utilisé permettra d'obtenir de bons taux de grossesse et d'accouchement (8).

Étant donné la sensibilité des gamètes et des embryons, chaque laboratoire pratiquant l'AMP doit se doter d'un système de management de la qualité permettant de limiter les causes d'atteintes embryonnaires (3). C'est d'ailleurs une obligation réglementaire figurant dans la Directive Européenne 2004/23/CE du Parlement Européen et du Conseil (9). La société savante européenne de médecine de la reproduction et d'embryologie, ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology), publie des guidelines ou recommandations de bonnes pratiques, indiquant les conditions minimales requises pour un laboratoire souhaitant pratiquer l'AMP, et pour favoriser l'existence d'un système qualité rigoureux dans tous les laboratoires d'AMP européens (10).

Les composés en contact avec les cellules tels que les milieux de culture ou consommables peuvent être néfastes et même les boites de culture ou autres éléments plastiques peuvent altérer le développement embryonnaire par l'intermédiaire d'une libération de Composés Organiques Volatils (COV). Aussi, une attention particulière doit-elle être apportée à l'étude de la repro-toxicité potentielle de tous les produits et éléments du laboratoire d'AMP (3,11). La loi française mentionne ces aspects dans le décret du 19 juin 2008 (transposition de la Directive Européenne 2004/23/CE) ainsi que dans l'arrêté du 3 août 2010 et l'arrêté du 30 juin 2017 (12–14). Les recommandations de bonne pratique de l'ESHRE mettent en évidence que tout réactif, milieu de culture ou consommable d'approvisionnement commercial entrant au laboratoire doit faire l'objet d'un suivi et d'un enregistrement dans le système qualité. Les consommables doivent permettre une culture cellulaire sans aucune toxicité. En d'autres termes, ils doivent être « reprosafe » et doivent donc être vérifiés par la réalisation d'un test de repro-toxicité sur embryons de souris « Mouse Embryo Assay » (MEA) (10,15). Les experts de la Société Américaine de Médecine de la Reproduction « American Society for Reproductive Medicine » (ASRM) recommandent également que tous les milieux soient testés par des contrôles qualités comme le MEA ou le « Human Sperm Survival Assay » (HSSA) (16).

Ces différentes références et guidelines de qualité au laboratoire d'AMP ont été établies dans la mesure où le taux de succès des tentatives de FIV est étroitement corrélé à la qualité des produits utilisés au laboratoire d'AMP. Le taux de fécondation en FIV et par la suite le taux de grossesses et d'accouchement sont de bons indicateurs dans la procédure qualité du laboratoire pour vérifier l'absence de toute anomalie. Cependant, une diminution de ces taux ne sera identifiée que plusieurs jours voire plusieurs semaines après, rendant tardive la détection d'un potentiel produit dangereux et la mise en place d'une action corrective (7,17). La réalisation de tests de repro-toxicité pour vérifier l'innocuité des milieux de culture, consommables et autres dispositifs sur les embryons et gamètes humains apparait donc essentielle dans la procédure qualité du laboratoire (18–21). De nombreuses méthodes d'évaluation ont ainsi émergé pour évaluer le plus précisément possible l'impact potentiel de tout élément en contact direct ou indirect avec l'embryon (22). Cette évaluation préalable à leur utilisation dans les protocoles d'AMP concerne tous les éléments utilisés au laboratoire lors de la préparation de sperme avant insémination intra-utérine (IIU), ainsi qu'à toutes les étapes de la FIV : lors de la récupération des ovocytes contenus dans le liquide folliculaire ponctionné, des manipulations embryonnaires et ovocytaires, de la culture embryonnaire, du transfert embryonnaire et de la congélation-vitrification des gamètes et embryons (18). Dans une première partie de ce travail, nous aborderons les principaux tests de repro-toxicité applicables en AMP.

Un composé peut impacter l'embryon ou les gamètes de manière indirecte par la libération de COV. La qualité de l'air au laboratoire d'AMP revêt donc une importance particulière. Les recommandations de l'ASRM stipulent même que la qualité de l'air représente un facteur critique au laboratoire d'AMP sans pour autant fixer de normes (16). La Directive Européenne 2006/86/CE renforce les exigences concernant les caractéristiques des laboratoires d'AMP sur le plan de la contamination microbienne et des particules présentes dans l'air. En revanche, une filtration des COV n'est pas spécifiquement obligatoire (23). En France, les recommandations détaillées dans l'arrêté du 30 juin 2017 relatif aux règles de bonnes pratiques font de même (14). *A contrario*, la réglementation Brésilienne exige une qualité de l'air type « salle propre » définie par l'ISO 14644-1 (maximum de 3530 particules de dimension supérieure ou égale à 0,5 $\mu m/m^3$) et précise que les systèmes de ventilation devraient être équipés de filtres comportant du charbon activé pour adsorber les COV (24). Or, les produits de bionettoyage utilisés dans les laboratoires peuvent tout à fait être à l'origine d'un dégagement de COV et les lois françaises indiquent même que ces produits bionettoyants doivent être choisis parmi ceux ne présentant pas de toxicité connue sur les gamètes, les tissus germinaux ou les embryons aux doses employées (12,13). Dans une deuxième partie de ce travail, nous établirons donc une description des principaux produits de bionettoyage utilisés dans les laboratoires d'AMP français ainsi qu'un rappel sur les COV et leurs effets repro-toxiques. Enfin, une partie expérimentale exposera les travaux de l'étude BIONETTOX-FIV, réalisée dans le but d'évaluer le potentiel impact indirect sur des spermatozoïdes humains des deux principaux produits de bionettoyage des étuves en AMP via un dégagement de COV. Ce travail a notamment permis de définir un nouveau mode opératoire *in vitro*, indicateur de repro-toxicité environnementale et de qualité de l'air au laboratoire d'AMP.

I Tests de repro-toxicité et AMP

I.1. La repro-toxicité et ses méthodes d'évaluation

La repro-toxicité désigne les altérations de la fertilité et les altérations du développement causées par des produits chimiques ou des facteurs physiques comme les radiations ionisantes ou la température. Par définition, la toxicité pour le développement *stricto sensu* correspond aux effets néfastes sur l'organisme en croissance depuis le stade embryonnaire jusqu'au moment de la maturation sexuelle. L'embryo-toxicité désigne les effets toxiques entre la conception et le stade fœtal. Enfin, la tératogénicité est définie par l'induction de malformations structurales après l'embryogenèse (25).

Pour évaluer la repro-toxicité d'un produit utilisé au sein d'un centre d'AMP, la méthode d'évaluation la plus appropriée est celle présentant la meilleure sensibilité, la meilleure robustesse, et celle mimant finalement le mieux les conditions du laboratoire dans lesquelles se retrouvent les gamètes et embryons humains lors de leur passage *in vitro* (19). Ce test doit être indépendant des facteurs cliniques pour prouver une véritable repro-toxicité inhérente au matériel ou produit testé (8). L'utilisation d'embryons humains étant interdite à des fins de recherche, plusieurs tests de repro-toxicité applicables au laboratoire d'AMP ont été développés (22).

Dans leur étude prospective d'une durée de 4 ans sur les tests de repro-toxicité, Nijs *et al*. ont répertorié l'utilisation de ces différents tests en AMP (18). Ils listent notamment l'ensemble des techniques disponibles, résumées dans la figure 2. En italique figurent les techniques simplement citées et non développées par la suite.

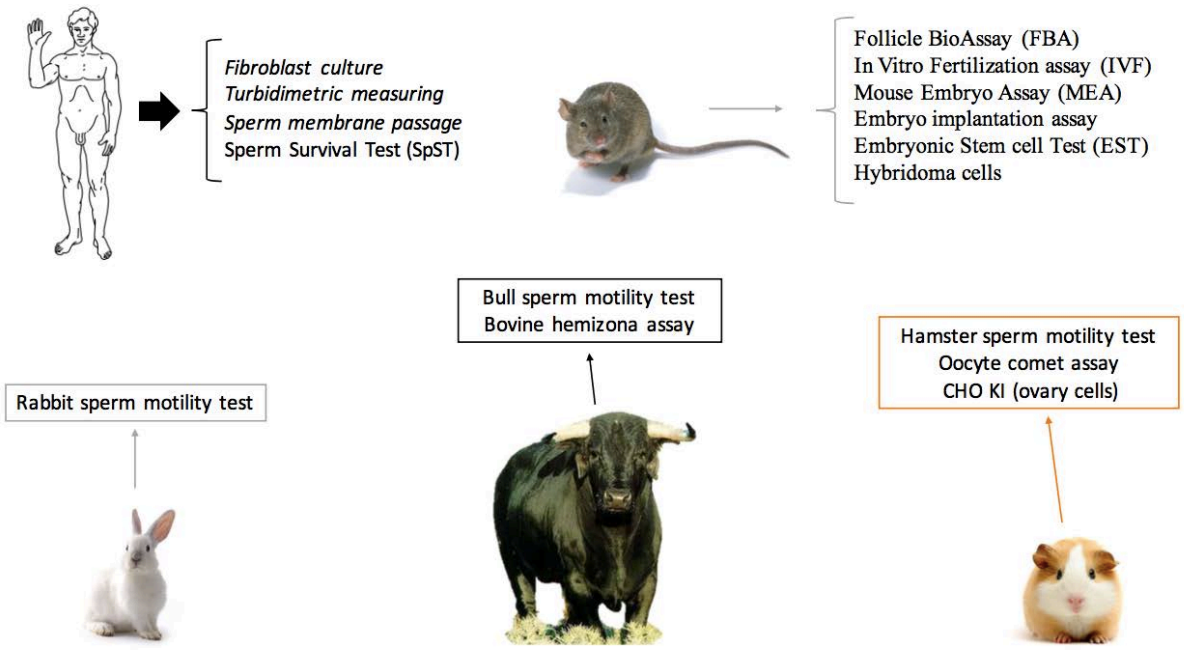


Figure 2 : Techniques d'évaluation de la repro-toxicité en AMP (d'après Nijs *et al.* (18))

I.2. Tests d'origine murine

L'ensemble des tests réalisables chez la souris offre un outil d'évaluation complet de la repro-toxicité potentielle d'une substance. Le « Follicle BioAssay » (FBA) permet d'analyser la fonction ovarienne *in vitro* et d'évaluer l'impact du composé à tester sur la folliculogenèse et la maturation ovocytaire *in vitro*. Le test « In Vitro Fertilization assay » (IVF) explore l'impact sur la fécondabilité des gamètes exposées à long terme. Le « Mouse Embryo Assay » (MEA) s'intéresse aux effets potentiels sur l'implantation embryonnaire et une embryo-toxicité précoce. Enfin, la toxicité sur l'organogenèse précoce est quantifiée par le test sur les cellules souches embryonnaires « Embryonic Stem cell Test » (EST) (26).

I.2.1. « Follicle BioAssay » (FBA)

Le FBA permet d'étudier la folliculogenèse, la maturation et la qualité ovocytaire *in vitro* (27).

Les ovocytes sont des cellules nécessitant une croissance longue et une maturation conséquente s'étalant sur plusieurs semaines chez la souris et plusieurs années dans l'espèce humaine. L'implantation embryonnaire nécessite que la ségrégation chromosomique ovocytaire ait eu lieu correctement. Les erreurs de ségrégation peuvent notamment mener à des aneuploïdies se traduisant par des avortements spontanés. Dans les protocoles d'études de repro-toxicité *in vivo*, l'analyse de la production d'ovocytes de bonne qualité est difficile à réaliser car peu d'ovocytes sont disponibles pour être analysés et leur durée de vie est courte après l'ovulation. De plus, l'ovaire est constitué d'un pool de follicules n'étant pas tous au même stade de développement et donc de vulnérabilité variable. L'interprétation de l'impact de l'exposition aux substances testées est donc particulièrement difficile. Le système de culture du follicule pré-antral de la souris permet la croissance et le développement *in vitro* de follicules pré-antraux précoces jusqu'au stade ovulatoire. Ce modèle expérimental mime donc la physiologie ovarienne féminine *in vivo* avec une différenciation folliculaire, une production hormonale et une réponse hormonale du follicule menant à sa maturation (27–29).

Ce modèle a largement été évalué pour sa reproductibilité et les conditions expérimentales à respecter ont été précisées par de nombreux auteurs dont Cortvrindt *et al*. (29). Le système de culture est basé sur l'utilisation d'une classe homogène de follicules pré-antraux intacts précoces de 100 à 130 µm de diamètre. Quarante follicules de cette classe sont ainsi collectés par des moyens mécaniques à partir d'une souris de 14 jours. Cette sélection rigoureuse et l'exposition à un milieu de culture défini contenant des gonadotrophines permettent une croissance synchrone pendant la culture. Dans un premier temps, les cellules thécales entament le processus d'adhésion à la boite de culture et commencent à proliférer. À partir des jours 4 à 6, la prolifération des cellules de la granulosa est visible par l'agrandissement du diamètre folliculaire et la perforation de la membrane basale. Ces cellules se multiplient au dessus de la monocouche de cellules thécales. Durant la seconde partie de la culture, les cellules de la granulosa se différencient en 2 sous-populations cellulaires : les cellules de la granulosa murale produisant des stéroïdes séparées par une cavité « antrale-like » des cellules du cumulus

enfermant étroitement l'ovocyte (cf figure 3 sur la structure du follicule tertiaire). Les follicules en cours de maturation sont très facilement observables au microscope et leur sécrétion hormonale peut être évaluée par dosage dans le milieu de culture (29).

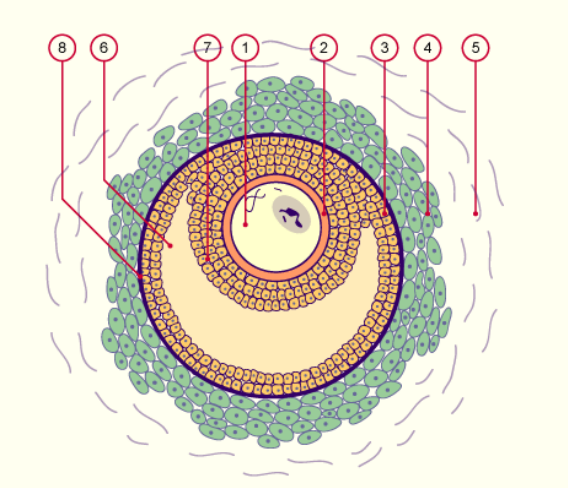


Figure 3 : Rappel sur la structure du follicule tertiaire (illustration du site www.embryology.ch)
Légende : 1) Ovocyte ; 2) Zone pellucide ; 3) Granulosa ; 4) Thèque interne ; 5) Thèque externe ; 6) Cavité folliculaire ; 7) Cumulus oophorus (disque proligère) ; 8) Membrane basale entre thèque et granulosa

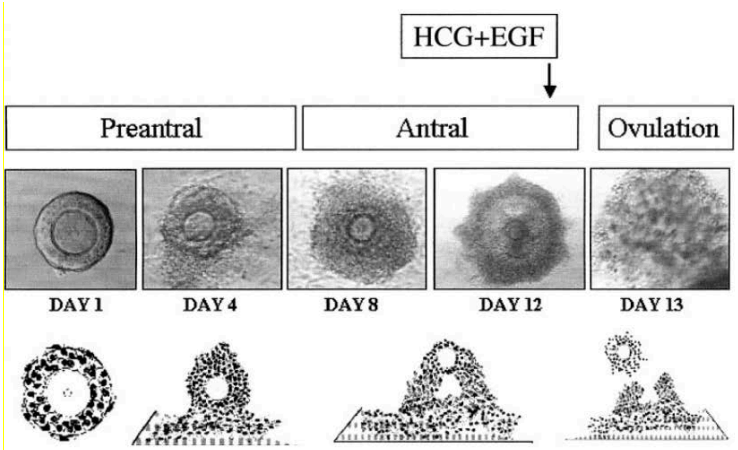


Figure 4 : Évolution morphologique du follicule au cours du FBA (29)

Pendant la folliculogenèse *in vitro*, l'ovocyte mature principalement (comme *in vivo*) pendant la phase pré-antrale et reste bloqué au stade de vésicule germinative aussi longtemps qu'il reste à l'intérieur de la structure folliculaire. Les follicules en culture sont FSH-dépendants pour leur croissance et deviennent capables de répondre à un stimulus par la LH à la fin de la culture. L'administration d'un stimulus ovulatoire par hCG ou LH au 12ème jour de culture provoque ainsi le détachement du complexe cumulo-ovocytaire, la mucification des cellules du cumulus et une reprise de la méiose dans l'ovocyte. Au même temps, une forte augmentation de progestérone peut être mesurée dans le milieu de culture. Ces ovocytes produits *in vitro* révèlent une morphologie du fuseau normale avec des chromosomes bien alignés comparables à des ovocytes *in vivo* dans les essais « contrôles » (29).

La substance à tester peut être incorporée de façon continue dans le milieu de culture, ou au contraire à des temps précis pour déterminer un mécanisme d'action potentiel et l'effet sur la maturation *in vitro* (27,29–31).

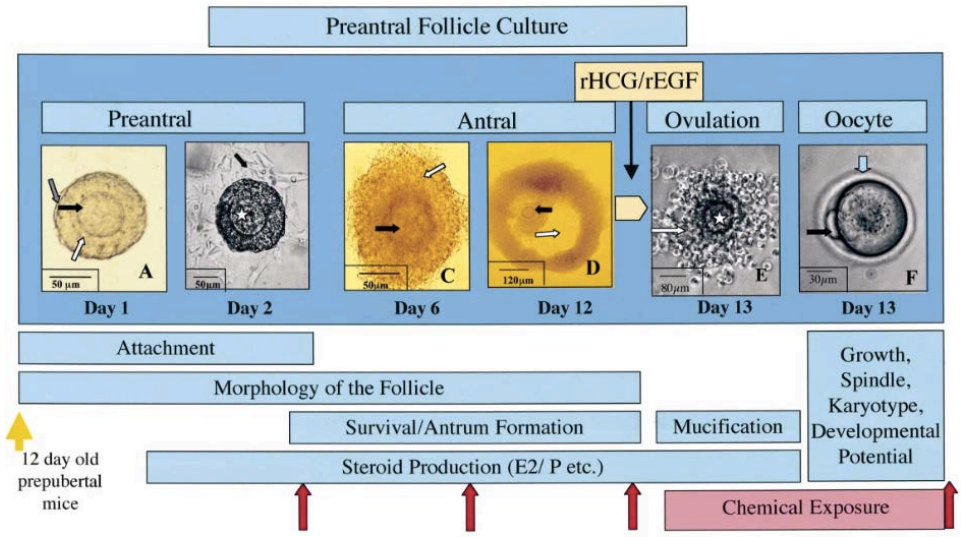


Figure 5 : Paramètres évalués au cours du FBA et périodes d'exposition à la substance testée (30)

L'évaluation du processus de folliculogenèse comprend différents paramètres :

- **Morphologie folliculaire** : observation microscopique tous les 4 jours ;
- **Survie folliculaire au 12ème jour** : nombre de follicules ayant retenu leur ovocyte. En effet, une libération ovocytaire précoce est associée à des effets cytotoxiques sur les cellules de la granulosa et une désorganisation de la structure folliculaire. Ce paramètre explore donc un potentiel impact cytotoxique du composé testé ;
- **Étape de différenciation au 12ème jour :** à la fin de la culture, presque tous les follicules doivent avoir progressé jusqu'à leur stade de différenciation. Si ce n'est pas le cas, cela peut signifier que la substance testée dans le milieu de culture peut bloquer la prolifération cellulaire, sans pour autant posséder un effet cytotoxique ;
- **Mucification des cellules du cumulus au 13ème jour :** Ce paramètre est un indicateur d'une différenciation normale et de l'expression de récepteurs à la LH par les cellules de la granulosa murale. Il reflète par ailleurs la viabilité des ovocytes à l'intérieur de la structure folliculaire (29).

L'évaluation du processus d'ovogenèse comprend différents paramètres :

- **Diamètre ovocytaire** : reflet de la croissance ovocytaire ;
- **Stade de maturation nucléaire de l'ovocyte** : premier indicateur de la qualité ovocytaire (vésicule germinative, rupture de la membrane de la vésicule germinative, émission du globule polaire) (29).

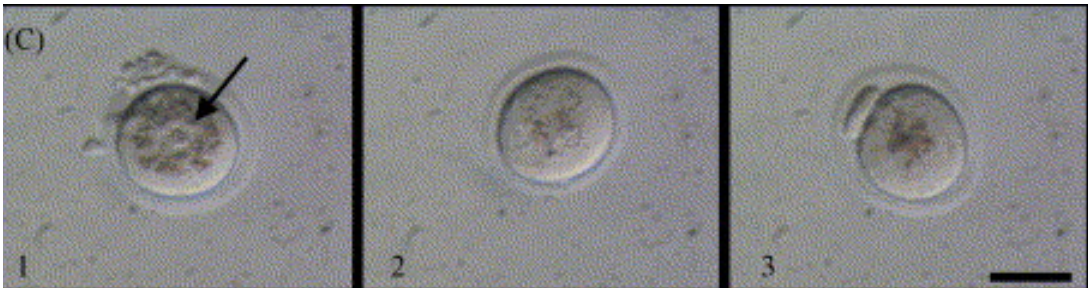


Figure 6 : Maturation nucléaire ovocytaire après stimulation hormonale (27)

Légende : (1) Stade vésicule germinative ; (2) Rupture de la membrane de la vésicule germinative (pas de globule polaire) ; (3) Stade métaphase II (globule polaire) (barre d'échelle : 50 µm).

Enfin, d'autres analyses peuvent être réalisées dans le milieu de culture (dosage des stéroïdes), sur les ovocytes ayant rompu leur vésicule germinative ou déjà en métaphase de première division méiotique et sur les ovocytes en métaphase de seconde division méiotique (avec globule polaire émis – analyse génétique par FISH sur le globule polaire permettant la détection d'aneuploïdies chez l'ovocyte et donc chez l'embryon) (29).

Pour être reproductible, le FBA doit se dérouler dans des conditions rigoureuses : sélection précise des souris par leur âge (12 à 14 jours), contrôle de la température (37°C), du pH, du taux d'humidité et de CO_2 dans les incubateurs, et composition constante du milieu de culture à l'exception de la substance à tester (29).

C'est un test efficace qui constitue un très bon outil informatif permettant d'évaluer les dangers d'une substance donnée sur la fertilité murine, extrapolée féminine, en précisant également le mécanisme d'action (27). La facilité d'obtenir un grand nombre de follicules et d'ovocytes murins avec cette méthode permet d'envisager une analyse aisée de nombreuses substances pour déterminer leur toxicité (dont le mécanisme d'action) et leur caractère aneugénique (30).

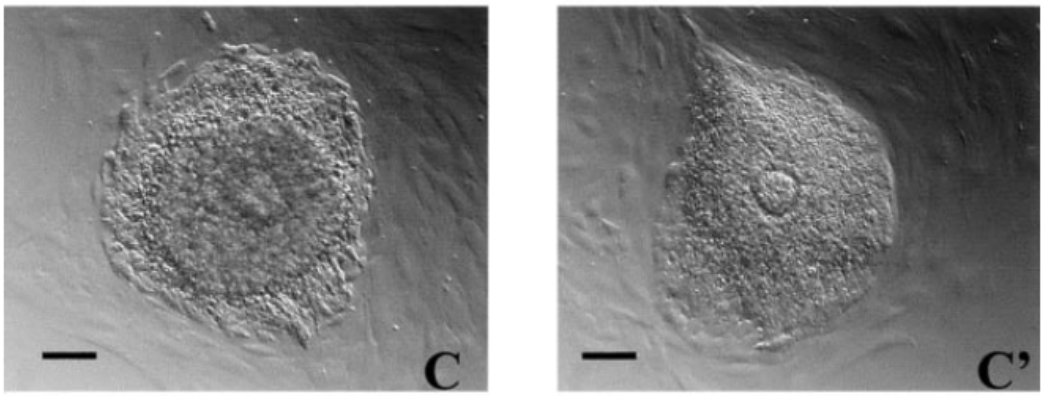


Figure 7 : Aspect morphologique des follicules pré-antraux murins en fonction de l'exposition à l'ARIMIDEX® (32)

Légende : (C) : Follicule témoin mis en culture pendant 6 jours. Après avoir développé une apparence « diffuse » par la prolifération continue des cellules de la granulosa, le follicule augmente de taille et forme un monticule (barre d'échelle : 45 µm) ; (C)' : Follicule cultivé avec 5 µmol/L d'ARIMIDEX® (inhibiteur d'aromatase) pendant 6 jours de culture : le follicule est devenu plus aplati et la vésicule germinative est mal recouverte par les cellules de la granulosa (barre d'échelle : 90 µm).

I.2.2. « In Vitro Fertilization assay » (IVF)

Le test IVF est réalisé à partir d'ovocytes exposés en continu à une substance à étudier durant leur maturation *in vitro* lors du FBA. Un contrôle est systématiquement réalisé en parallèle en utilisant des ovocytes matures obtenus dans l'oviducte de souris témoins. L'incubation pour l'IVF se fait ensuite avec du sperme capacité provenant de souris mâles fertiles. Trois heures après, les ovocytes sont lavés et replacés dans un milieu de culture pendant 6 jours de manière à ce que les embryons formés atteignent le stade blastocyste (26,32).

Le taux de fécondation est estimé par le taux de zygotes 2 cellules obtenus après 24h et le taux de développement embryonnaire est calculé au stade blastocyste. La comparaison avec le groupe contrôle permet de conclure à un effet de la substance testée (26,32).

I.2.3. « Mouse Embryo Assay » (MEA)

Historiquement, de nombreux auteurs dont Quinn *et al*. ont utilisé le MEA en tant que contrôle qualité pour tester les milieux de culture, l'eau utilisée pour leur préparation (potentielle source de toxiques), mais aussi les techniques pratiquées ensuite dans les protocoles d'aide médicale à la procréation chez l'Homme (7,22,33–37). Le MEA a été le principal contrôle qualité des laboratoires d'AMP au début de l'ère de la FIV. En Mai 1997, l'American Association of Bioanalysts (AAB) recensait une utilisation de ce test par 90% des laboratoires de FIV américains participant à leur étude statistique (159 laboratoires) (7). L'étude de Parinaud *et al*. montre que ce test doit se réaliser avant utilisation du consommable dans la routine du laboratoire afin d'éviter tout accident. Les auteurs avaient mis en évidence *a posteriori* l'embryo-toxicité d'un type de cathéter avec un MEA et avaient conclu que si ce test avait été pratiqué avant l'utilisation des cathéters toxiques, il aurait permis d'éviter une baisse importante des taux de grossesses (21).

Dans ce test, des souris femelles suivent un protocole de stimulation ovarienne jusqu'au déclenchement du pic ovulatoire par injection d'hCG. Elles sont ensuite mises en contact avec des souris mâles fertiles. Le lendemain de l'accouplement, les zygotes sont collectés dans les oviductes des souris femelles présentant des bouchons vaginaux (bouchons de copulation), 18h après l'induction de l'ovulation. Ils sont libérés des cumulus (action mécanique et enzymatique avec utilisation de hyaluronidase) avant d'être observés au microscope. La distinction entre zygotes et ovocytes non fécondés se fait par la présence chez les premiers d'un second globule polaire aplati dans l'espace périvitellin et de 2 pronuclei. Ces zygotes fécondés sont incubés 6 jours à 37°C, 100% d'humidité et 6% de CO_2 pour atteindre le stade blastocyste. Le milieu de culture est supplémenté avec la substance à tester pour évaluer son impact sur le développement embryonnaire précoce. Un groupe contrôle est systématiquement constitué pour prouver l'impact du composé étudié (cf figure ci-après montrant l'essai de Van Merris *et al*. sur l'impact de la dexamethasone) (33,38).

L'embryon en phase pré-implantatoire passe par différentes phases métaboliques, en partant du stade zygote pour atteindre le stade blastocyste. Pendant ce processus de différenciation, il subit d'importants changements morphologiques (38).

Les cultures embryonnaires sont donc observées quotidiennement et les paramètres relevés sont les suivants :

- J2 : Taux d'embryons à 2 cellules (nombre d'embryons à 2 cellules à J2 rapporté au nombre de zygotes mis en culture à J1) ;
- J5 : Taux de blastocystes (nombre de blastocystes à J5 rapporté au nombre d'embryons à 2 cellules à J2) ;
- J6 : Taux de blastocystes et capacité à éclore (libération totale ou partielle du blastocyste de la zone pellucide), ceci étant corrélé à la capacité d'implantation de l'embryon (38).

Si plus de 80% des zygotes ont atteint le stade blastocyste, le milieu de culture ou le consommable de laboratoire testé est considéré comme non repro-toxique (22).

Quinn *et al*. concluent à une plus grande sensibilité des zygotes à 1 cellule à des conditions de culture suboptimales, par rapport aux embryons à 2 cellules ou aux stades postérieurs (33). D'autres auteurs, dont Davidson *et al*., étayeront par la suite cette conclusion (22,39). Par la mise en contact d'embryons murins avec différentes substances, ils ont pu identifier et minimiser l'effet de plusieurs facteurs conduisant à une diminution de la viabilité embryonnaire dans les protocoles d'AMP (33).

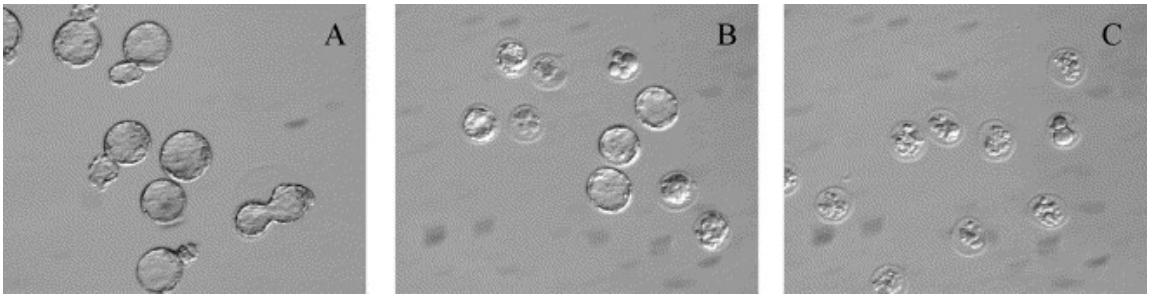


Figure 8 : Images représentatives de blastocystes à J6 de la culture (38)

Légende : (A) 100% de blastocystes (test contrôle) (B) 25 ± 7% de blastocystes en présence de 40 µg/mL de dexamethasone (C) 0% de blastocystes en présence de 80 µg/mL de dexamethasone

Bien que très utilisé, ce test est toutefois controversé pour différentes raisons. Gorrill *et al*. soulignent une variabilité importante inter-animal (entre lignées), inter-opérateurs et inter-tests ce qui constitue une limite du MEA (40). Certains auteurs comme Fukuda *et al*. ont montré une excellente corrélation du développement embryonnaire murin avec la qualité de l'eau utilisée pour la préparation des milieux de culture (41). A l'inverse, d'autres auteurs comme George *et al*. ont démontré que la pureté de l'eau n'avait aucun impact sur l'obtention d'embryons murins de bonne qualité (42). En cela, les embryons murins seraient donc plus résistants que les embryons humains (notamment à l'action d'endotoxines bactériennes), et le MEA serait donc un test insuffisant pour conclure à une absence d'effet repro-toxique d'une substance étudiée par ce test seul (42,43). Randall et Gantt ont d'ailleurs prouvé que des concentrations en endotoxines bactériennes significativement plus élevées sont nécessaires pour observer une fragmentation des embryons murins par rapport aux embryons humains, beaucoup plus sensibles à l'action de ce type de toxines (44). Cependant, ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par la différence de composition protéique des milieux testés par les différents auteurs. En effet, Flood *et al*. ont conclu par leur étude que la présence

de protéines, comme l'albumine, pourrait protéger les embryons pendant la culture en chélatant les substances embryo-toxiques présentes dans les milieux de culture. Cet effet masquerait donc les effets repro-toxiques d'une substance étudiée en MEA (45). Ainsi, les protocoles de MEA ont été revus au cours des années suivantes en diminuant notamment la concentration protéique des milieux utilisés, ceci favorisant l'apparition d'un effet repro-toxique potentiel (22). Cependant, devant le nombre important d'animaux à utiliser pour démontrer une repro-toxicité à l'aide de ce test, Gorrill *et al*. conseillent de limiter son usage pour démontrer un effet « tout ou rien » embryo-toxique d'une substance (40).

Plusieurs auteurs dont Gardner *et al*. ou encore Gorrill *et al*. relèvent d'autres limites du MEA en insistant sur le caractère chronophage et coûteux de ce test, à réaliser de façon hebdomadaire pour un laboratoire d'AMP s'il est utilisé en tant que contrôle qualité (22,40). Par ailleurs, les auteurs rappellent que le MEA ne s'intéresse qu'au taux d'embryons obtenus sans tenir compte du potentiel de développement embryonnaire. Celui-ci peut s'évaluer en appréciant certains éléments embryonnaires comme le nombre de blastomères, comme c'est le cas lors des procédures de FIV (22,46). De plus, le MEA ne permet pas un screening complètement informatif de la repro-toxicité d'un milieu de culture. En effet, selon ces auteurs, effectuer des transferts d'embryons est le moyen ultime de tester la capacité d'un milieu à permettre un développement embryonnaire viable. Ceci s'explique par le fait que les effets chroniques des endotoxines, potentiellement présentes dans le milieu, sont généralement manifestes après le transfert. Enfin, il n'existe aucune garantie qu'un milieu de culture ayant démontré son innocuité sur le développement embryonnaire murin soit de façon certaine non toxique pour les embryons humains (22).

I.2.4. « Embryo implantation assay »

Le transfert embryonnaire est une étape cruciale pour finaliser les procédures d'AMP.

Le test « embryo implantation assay » correspond au transfert d'embryons de souris à des mères porteuses dans le but d'évaluer le taux d'implantation embryonnaire suite à ce transfert. Ce test a surtout servi à perfectionner la technique de transfert mais aussi à évaluer les différentes méthodes, et enfin à vérifier l'innocuité des consommables utilisables durant cette étape (47).

Cependant, des taux variables d'implantation chez la souris peuvent être observés. Ceci s'explique par les différentes techniques utilisées, la réceptivité endométriale, les contractions utérines, les anomalies génétiques et la qualité des embryons, la présence de sang ou de mucus, ou encore la contamination bactérienne des pipettes de transfert (48).

I.2.5. « Embryonic Stem cell Test » (EST)

L'EST explore l'embryo-toxicité post-implantation et l'impact d'une substance à tester sur l'organogenèse précoce et le développement (26).

La méthode de l'EST est basée sur l'étude des altérations induites par un composé étudié sur la différenciation spontanée des « mouse embryonic stem cell line D3 » (ES-D3) en cardiomyocytes contractiles, après 10 jours de culture menant à la formation de corps embryoïdes avec activité cardiaque. Cette étude est donc indicatrice d'une toxicité sur le développement. Genshow *et al*. ont précisé les conditions expérimentales et le test a été validé sous la supervision de l'European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). En outre, cette méthode ne nécessite pas le sacrifice d'animaux car elle utilise une lignée cellulaire continue disponible dans le commerce. Les lignées de cellules souches embryonnaires sont issues de la masse cellulaire interne du blastocyste et ont la capacité de se différencier en tous les types cellulaires des 3 couches germinales primaires comme le montre la figure ci-après (25,49,50).

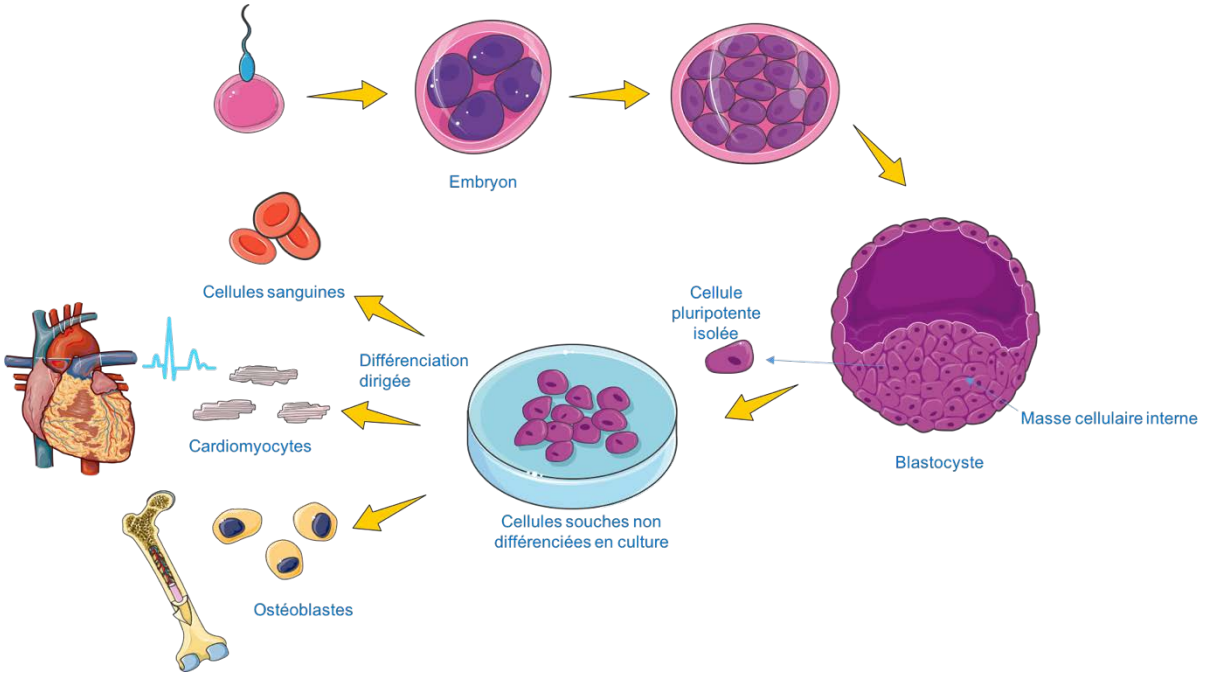


Figure 9 : Origine et devenir des cellules souches embryonnaires (d'après Servier Medical Art)

Lors de ce test, d'autres paramètres sont aussi évalués comme l'impact de la substance étudiée sur la viabilité des cellules ES-D3 et sur celle d'un autre type cellulaire : les fibroblastes 3T3 de souris (25,49,50).

Trois indicateurs sont ainsi calculés :

- ID_{50} : concentration de la substance entrainant une diminution de 50% de la différenciation des ES-D3 indifférenciées en cardiomyocytes contractiles ;
- IC_{50D3} : concentration de la substance entrainant une diminution de 50% de la viabilité des cultures d'ES-D3 ;
- IC_{503T3} : concentration de la substance entrainant une diminution de 50% de la viabilité des cultures de 3T3 (25).

Ces trois données sont ensuite analysées par trois fonctions linéaires discriminantes empiriques (définies par Genshow *et al*.) qui permettent de classer le produit chimique évalué

en fonction de son embryo-toxicité *in vivo* dans l'une des trois catégories suivantes : (1) embryo-toxiques puissants ; (2) embryo-toxiques faibles ; (3) non embryo-toxiques (25,26).

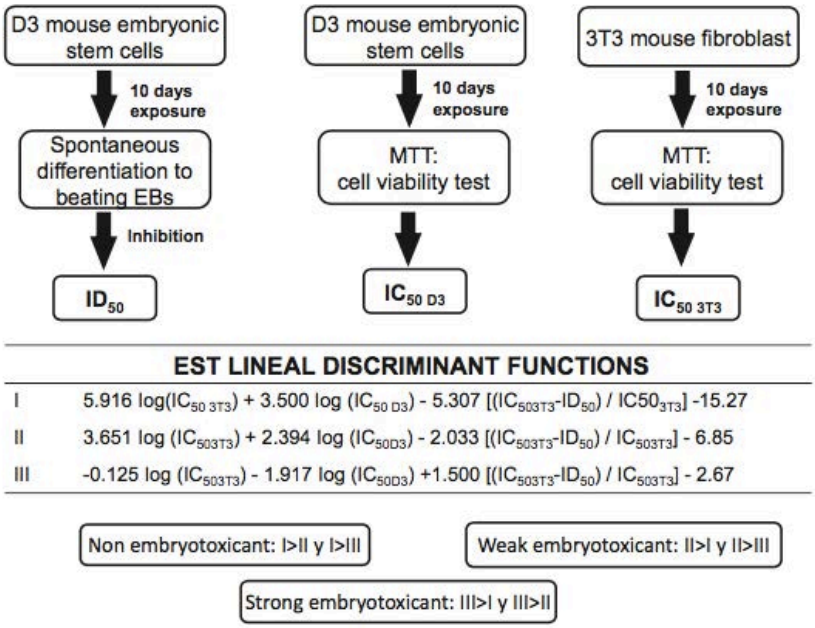


Figure 10 : Aperçu global du test sur cellules souches embryonnaires murines ES-D3 (25)

Le principal inconvénient de l'EST est le manque de précision dans l'évaluation des altérations de différenciation des cellules ES-D3. Les modifications de la différenciation sont appréciées par microscopie optique en se basant sur un unique critère : la présence ou non d'un battement par les cardiomyocytes produits. Ainsi, d'autres variables comme la surface totale du battement, la fréquence du battement, la morphologie même des cardiomyocytes ne sont pas évaluées. Une amélioration du procédé est donc envisageable selon Sogorb *et al*., notamment pour la discrimination entre substances embryo-toxiques faibles et substances non embryo-toxiques (25). Par ailleurs, l'interprétation de l'analyse est limitée à un seul type cellulaire de différenciation (cardiomyocytes) et les substances qui affectent des voies de différenciation alternatives peuvent ainsi être négligées. Des études ont donc été réalisées par de nombreux auteurs comme De Jong *et al*. pour évaluer la différenciation des cellules souches embryonnaires murines en d'autres types cellulaires que les cardiomyocytes. De Jong *et al*. ainsi que d'autres auteurs ont de ce fait étudié la différenciation en ostéoblastes (50–52).

I.2.6. « Hybridoma cells »

La méthode d'évaluation de repro-toxicité par l'utilisation de cellules « hybridoma cells » est basée sur la culture de cellules murines de lignée « hybridome 1E6 » (définie par Kölher et Milstein (1975)) dans un milieu défini ne contenant pas de sérum. L'absence de sérum et donc l'absence de protéines sériques augmente grandement la sensibilité cellulaire aux substances toxiques. En effet, ces composés ne seront pas liés aux protéines du sérum et donc leur toxicité en sera augmentée. C'est un test simple en comparaison du MEA, plus complexe et chronophage. De plus, la procédure du MEA implique l'utilisation d'un milieu contenant du sérum et donc des protéines de liaison telles que l'albumine, des anticorps ou encore la

transferrine. Cette caractéristique du MEA, dont la technique par cellules d'hybridome est dépourvue, pourrait constituer un biais de diminution de toxicité évoqué par Bertheussen *et al*. Le test sur cellules d'hybridome 1E6 a également montré une forte reproductibilité et peut ainsi constituer un contrôle de qualité au laboratoire d'AMP pour la qualification des milieux de culture, de l'eau, des composés chimiques et des consommables ou autres équipements entrant dans les processus d'AMP (53).

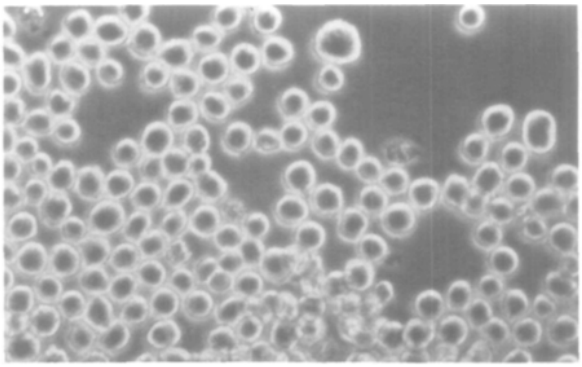


Figure 11 : Cellules murines d'hybridome 1E6 (53)

Un index de cytotoxicité (pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire) peut ainsi être calculé en observant en parallèle une culture « contrôle » ne contenant pas de substance à tester dans son milieu (53).

I.3. Autres tests d'origine animal

I.3.1. Tests effectués avec des lapins

Le principal test d'évaluation de repro-toxicité en AMP utilisant des gamètes de lapins est le « rabbit sperm motility test » (18). L'objectif est d'évaluer les paramètres de mobilité de spermatozoïdes de lapins et l'évolution de ces paramètres après incubation pendant 6 heures en présence de substances chimiques à tester (54).

Cette méthode initialement développée pour une analyse automatique assistée par ordinateur permet de détecter de façon rapide et avec une grande sensibilité tout changement dans la mobilité spermatique. Elle permet au final un suivi au cours du temps de l'impact potentiel d'une substance chimique sur cette mobilité. En comparaison des autres méthodes *in vitro* utilisant des animaux entiers, cette technique est plus rapide et moins chère que les tests toxicologiques. Elle permet, en outre, d'éviter un sacrifice animal. Le recueil des spermatozoïdes est très simple et se réalise à l'aide d'un vagin artificiel. Les spermatozoïdes sont ensuite sélectionnés par un gradient Percoll et remis en suspension dans un milieu de culture approprié capacitant. Cette suspension est alors incubée pendant 6 heures à 37°C avec ou sans la substance à tester à une concentration donnée. La lecture de la mobilité est réalisée ensuite par le système d'analyse automatique assistée par ordinateur (54).

A la fin des années 1980, plusieurs auteurs dont Working et Hurtt, Toth *et al*. ou encore Knuth *et al*. ont cherché à démontrer l'utilité d'un test basé sur la diminution de la mobilité spermatique pour l'identification de toxiques sur la fertilité masculine. Young *et al*. ont ainsi évalué l'efficacité de ce test dans la détection de la toxicité de différents composés chimiques (hydroquinone, pyrogallol, oxalate d'ammonium, triethyl phosphite et alcool pinacolylique), dans l'objectif de corréler une baisse de mobilité spermatique avec un effet cytotoxique. Leur travail avait ainsi pour but de montrer qu'une diminution de la mobilité spermatique était un reflet d'un effet toxique *in vitro*. Selon eux, les spermatozoïdes d'autres espèces répondraient différemment à ce genre de test par rapport aux spermatozoïdes de lapin, bien qu'une diminution relative de la mobilité serait également observée chez ces autres espèces. L'homogénéité du sperme de lapin et sa disponibilité en grande quantité (en particulier dans les laboratoires avec une activité de recherche) rendent les spermatozoïdes de lapin particulièrement adaptés pour les essais de repro-toxicité. Toutefois, les auteurs rappellent que certains composés pourraient n'avoir aucun effet sur la mobilité spermatique mais uniquement sur l'hyper-activation des spermatozoïdes, ce qui pourrait par la suite compromettre la fécondation (54).

I.3.2. Tests effectués avec des hamsters

I.3.2.a. « Hamster sperm motility test »

Le « sperm motility test » utilisant des spermatozoïdes de hamsters a été étudié par Bavister *et al*. à fin des années 1980, pour tester principalement de l'eau ou des milieux de culture (18,55,56). Stewart-Savage et Bavister utilisent un sperme épididymaire de hamster. Pour se faire, ils sacrifient les animaux par dislocation cervicale et récupèrent chirurgicalement les spermatozoïdes localisés au niveau épididymaire. Après 2h, 4h et 6h d'incubation des spermatozoïdes avec la substance à tester, le « Sperm Motility Index » (SMI) ou indice de mobilité des spermatozoïdes est évalué. Le SMI est constitué de deux parties : le pourcentage de spermatozoïdes mobiles (évalué à l'objectif x20) et la qualité de la mobilité du sperme (évaluée à un grossissement de x40). La qualité de la mobilité est estimée sur une échelle de 1 à 5, arbitraire et de mobilité croissante. Le grade 5 est donné à des spermes dans lesquels plus de 70% des spermatozoïdes mobiles montrent une hyperactivation. L'indice de mobilité des spermatozoïdes est calculé de la manière suivante : SMI = pourcentage de spermatozoïdes mobiles x (grade de mobilité)^2. Seuls les SMI de 6 heures sont utilisés dans l'interprétation de l'impact d'un composé étudié car, selon les auteurs, une plus grande sensibilité du sperme aux conditions de culture est observée à cet instant (55). Concernant les caractéristiques du milieu de culture, Bavister and Andrews ont montré qu'une supplémentation protéique diminue la sensibilité du test en raison des capacités de l'albumine à chélater les substances toxiques (comme évoqué ci-avant dans la partie MEA) (56).

Pour Stewart-Savage et Bavister, ce type de test est à préférer par rapport au MEA car l'impact d'une substance sur l'embryon murin étudié *in vitro* ne serait pas corrélé à son impact *in vivo* (55). De nombreux avantages sont évoqués dans la littérature. D'après Gorrill *et al*. un petit nombre de hamsters suffit pour réaliser régulièrement ce test (40). Rinehart *et al*. présentent le « hamster sperm motility test » comme supérieur au MEA pour la détection de

toxiques présents dans l'eau de préparation des milieux de culture utilisés en FIV (20). De nombreux autres auteurs qualifient aussi ce test d'extrêmement sensible (supérieur au MEA) pour la détection de potentiels toxiques, très reproductible, et le conseillent donc dans le processus qualité d'un laboratoire d'AMP (20,40,43,56,57).

Plusieurs limites peuvent toutefois être relevées : une étude de l'impact d'une substance sur une mobilité spermatique ne donne aucune information sur un potentiel effet de la substance étudiée sur le processus de division cellulaire ou d'autres aspects de l'embryogenèse (7). De plus, les méthodes à l'instar du « sperm motility test » avec des spermatozoïdes de hamster nécessitent le logement d'une colonie de hamsters mâles et une formation spécifique pour effectuer l'analyse (8,58). Enfin, ce test ne permet pas d'évaluer des milieux de culture contenant des protéines en raison d'une agglutination spermatique induites par ces protéines (40).

Esterhuizen *et al*. ont comparé l'utilisation de spermatozoïdes de hamster et l'utilisation de spermatozoïdes de souris pour la réalisation de « sperm motility test » : l'objectif était de détecter de faibles concentrations en endotoxines dans des milieux de culture. Ils expliquent notamment que la disponibilité des souris est plus grande que celle des hamsters en Afrique du Sud (où leur étude a été réalisée), ce qui confère un avantage au choix des souris (43). Ce problème de disponibilité est aussi évoqué par Reed and Petters (57). Par ailleurs, une plus grande sensibilité des spermatozoïdes murins après de courtes incubations (4h) serait un autre argument pour le choix murin. Ce « mouse sperm motility test » représente en tous les cas une alternative valable à l'utilisation du « hamster sperm motility test » (43). Reed and Petters corroborent ces affirmations mais évoquent une plus grande sensibilité absolue (quelque soit le temps d'incubation) des spermatozoïdes de hamsters. Leurs travaux montrent également que des spermatozoïdes de souris ou de rat peuvent être utilisés en alternative dans ces tests de mobilité (57).

I.3.2.b. « Oocyte comet assay »

Plus récemment au début des années 2000, devant l'absence de nouveaux tests de repro-toxicité en AMP, Chan *et al*. ont développé un test d'évaluation de l'impact d'un composé sur l'ADN d'ovocytes cryoconservés de hamster, nommé « oocyte comet assay ». Cette méthode utilise le principe du « COMET assay » pour évaluer la fragmentation de l'ADN d'ovocytes cryoconservés de hamster, les ovocytes étant préalablement mis en contact avec un composé à étudier dans un milieu de culture approprié. Les auteurs ont adapté ce test, destiné à l'origine pour une utilisation sur des leucocytes sanguins nombreux, à la faible quantité de matériel ovocytaire disponible. Leur hypothèse était que les substances toxiques causeraient une fragmentation de l'ADN sur des ovocytes en métaphase II. Le résultat de leur test montre que cette méthode rapide par rapport au MEA montre en plus une meilleure sensibilité. Par ailleurs, étant basé sur une fragmentation de l'ADN, le test détecte toutes les substances pouvant impacter directement la génétique embryonnaire et gamétique. L'ICSI excluant toutes les étapes précoces de la fécondation, Chan *et al*. considèrent qu'un test de repro-toxicité doit permettre d'élucider des effets directs sur l'ADN plutôt qu'un impact global sur une mobilité spermatique par exemple. Le « oocyte comet assay » est un test rapide (environ 1 jour),

abordable en tarif (utilisation de lames de verre), ne nécessitant pas d'ovocytes à un stade donné du cycle cellulaire, détectant directement des effets sur l'ADN et facilement réalisable. Il est à noter que les ovocytes cryoconservés étaient du même type que ceux utilisés habituellement pour le test de pénétration du sperme. Les inconvénients correspondent à la nécessité d'un microscope à fluorescence et d'un logiciel associé (58).

I.3.2.c. Test sur lignée cellulaire CHO KI

Ray *et al*. ont réalisé des études de repro-toxicité de cathéters sur des lignées cellulaires ovariennes de hamsters, avec les cellules CHO KI. Dans ce type d'étude, chaque échantillon à tester (morceau de cathéter) est placé au centre de la surface de pousse cellulaire de la flasque de culture. Cette flasque contient une concentration de 500000 cellules CHO KI pour 5 mL de milieu de culture et l'incubation dure 24h à 37°C. Les paramètres évalués sont l'attachement et la croissance cellulaire. Il est à noter que Ray *et al*. ont utilisé en parallèle, et selon la même méthodologie, des lignées cellulaires humaines de fibroblastes, présentant une meilleure sensibilité. Par la suite, ils ont également mis en évidence une diminution du potentiel de formation de colonies de cellules issues du liquide amniotique humain, mises en culture en présence de ces mêmes cathéters. Les auteurs concluent que l'utilisation de cellules du liquide amniotique, disponibles de part leur présence en laboratoire de cytogénétique, présente un réel intérêt en tant que contrôle qualité au laboratoire, en raison de leur sensibilité supérieure aux toxiques comparativement aux autres modèles d'études disponibles (59).

I.3.3. Tests effectués avec des bovins

I.3.3.a. « Bull sperm motility test »

L'utilisation de spermatozoïdes de taureau (Holstein noir) dans le cadre d'études de repro-toxicité en AMP a été envisagée dans les années 1980 (60,61).

L'utilisation de gamètes bovins à des fins cliniques et scientifiques offre plusieurs avantages. Le sperme bovin a un haut degré d'homogénéité cellulaire, est immédiatement accessible et peut être stocké facilement pendant une longue période. Des quantités suffisantes de spermatozoïdes peuvent être obtenues auprès des centres d'insémination artificielle ou des écoles vétérinaires. L'utilisation d'aliquots cryoconservés et bien caractérisés de spermatozoïdes bovins congelés/décongelés est une bonne alternative à l'utilisation de spermatozoïdes d'animaux de laboratoire comme les souris. Cependant, les données obtenues avec le sperme bovin ne peuvent pas être extrapolées directement aux gamètes humains. En effet, les taureaux ont été sélectionnés pendant plusieurs générations pour leur capacité de reproduction, et la qualité globale du sperme pourrait donc être plus élevée et plus homogène. Finalement, ce sperme serait moins sensible aux substances toxiques que le sperme humain (61).

Les premières études ont été réalisées dans l'optique de définir un nouveau test de cytotoxicité, utilisable dans les études toxicologiques, et ne nécessitant pas de difficiles cultures cellulaires stériles. Ces études de cytotoxicité *in vitro* avec du sperme de taureau ont montré une corrélation forte entre diminution de la mobilité spermatique causée par un certain nombre de substances toxiques et mort cellulaire. Entre autre, l'objectif du travail de Kemp *et al*. a été

de comparer la mobilité et vitalité spermatiques avec la mesure de l'ATP cellulaire comme reflet de la toxicité sur les spermatozoïdes. Leurs travaux montrent ainsi que le contenu cellulaire en ATP, la mobilité spermatique et la vitalité spermatique donnent des résultats similaires dans le cadre de l'évaluation d'une substance toxique (ceci étant logique dans la mesure où la génération d'ATP est adaptée à la mobilité spermatique) (60).

Par ailleurs, Hinsch *et al*. ont établi un modèle utilisant des gamètes d'origine bovine et ont montré une absence de différence dans les fonctions spermatiques entre sperme frais et aliquots cryoconservés de spermatozoïdes. Ainsi, ces pools de spermatozoïdes de taureau cryoconservés (présentant des caractéristiques spermatiques parfaitement connues) permettent de réaliser des tests reproductibles (61).

I.3.3.b. « Bovine hemizona assay »

En utilisant du sperme cryoconservé, Hinsch *et al*. ont mis en évidence que la procédure de coloration PSA-FITC/Hoechst 33258 était applicable pour évaluer le statut acrosomique et la viabilité cellulaire. Ils ont alors développé un test appelé « bovine hemizona assay » (61).

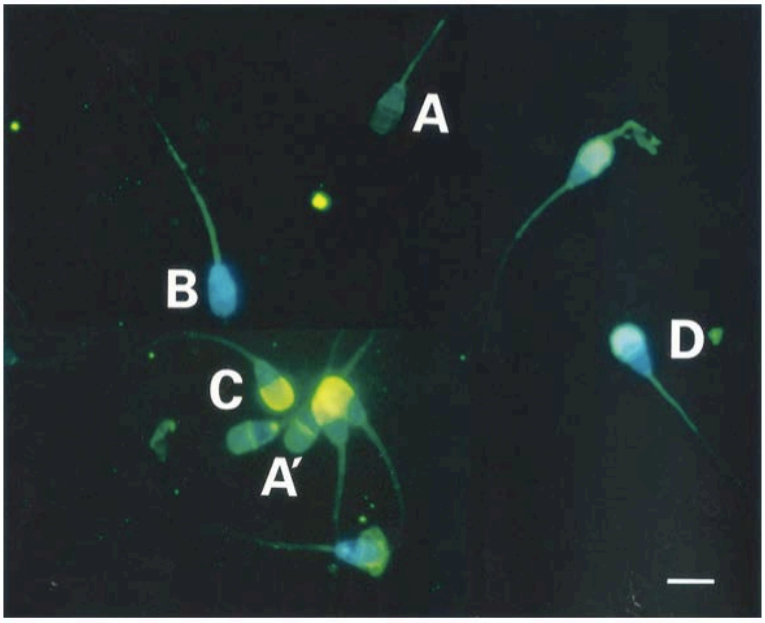


Figure 12 : Viabilité et état acrosomal des spermatozoïdes bovins cryoconservés Biociphos® décongelés, tels que déterminés par Hoechst 33258 et PSA-FITC (61)

Légende : A, A' : vivant, réaction acrosomale faite ; B : mort, réaction acrosomale faite ; C : vivant, acrosome intact ; D : mort, acrosome intact (barre : 10 µm)

Les xénobiotiques ou substances toxiques peuvent perturber des mécanismes de signalisation intracellulaire résultant en différents effets comme une baisse de la mobilité spermatique ou des perturbations dans l'interaction entre sperme et ovocyte. Dans le test « bovine hemizona assay », en induisant une réaction acrosomale *in vitro* par ajout de progestérone, ce sont ces perturbations d'interaction qui sont recherchées. En effet, en plus des effets sur la mobilité ou la vitalité, l'intégrité acrosomale, la capacité d'effectuer une réaction acrosomique appropriée et la capacité de liaison du sperme à l'ovocyte pourraient être affectées par les xénobiotiques. Selon les auteurs, un système de test *in vitro* étendu évaluant un certain

nombre de fonctions physiologiques du sperme pourrait être plus sensible pour la détection des risques potentiels pour la fertilité masculine. Les tests de type « hemizona assay » existent aussi par ailleurs avec des spermatozoïdes humains : Burkman *et al*. ont été les premiers auteurs à décrire une telle méthode à la fin des années 1980 (61).

I.4. « Human Sperm Survival Assay » (HSSA) ou « Sperm Survival Test » (SpST)

L'utilisation de spermatozoïdes humains comme bio-indicateurs de toxicité a depuis longtemps été envisagée et différents tests ont émergé au fil des années. Certains auteurs ont développé des méthodes de migration transmembranaire pour mesurer l'effet d'un xénobiotique sur la mobilité spermatique, tandis que d'autres s'intéressaient à des méthodes plus complexes, spectrophotométriques ou encore turbidimétriques (62). Le « Human Sperm Survival Assay » (HSSA) ou « Sperm Survival Test » (SpST) a ensuite rapidement été adopté par la communauté scientifique de par ses nombreux avantages. Aux débuts de l'ère de la FIV, Edwards et Steptoe utilisaient d'ailleurs ce test pour vérifier l'absence d'influence péjorative des réactifs et matériaux utilisés au cours du processus de FIV au laboratoire (1). Le HSSA est actuellement une méthode appréciée dans les laboratoires d'AMP et est utilisé en routine comme contrôle qualité « maison », de par sa facilité d'intégration dans la procédure qualité du laboratoire (18,63). Critchlow *et al*. ont été parmi les premiers à se pencher sur l'utilisation du HSSA comme un contrôle qualité complètement intégré dans la procédure de FIV au laboratoire d'AMP (8). Il est à noter que le HSSA a par ailleurs été utilisé comme test prédictif du taux de fécondation en FIV et du taux de grossesse (64–66). La méthodologie est alors différente du HSSA « classique » décrit ci-après en raison notamment d'une incubation de 4h à 40°C pour induire des conditions de stress spermatique (65).

Le HSSA permet de détecter d'éventuels facteurs ou toxines pouvant affecter le développement embryonnaire *in vitro* par corrélation à l'impact spermatique observé (1,18,22,63). Son utilisation présente de nombreux avantages : c'est un test très peu couteux, rapide, facile à réaliser et fiable. Le sperme humain utilisé est obtenu à partir d'échantillons de sperme donnés à la recherche médicale. L'attitude des patients envers le don de sperme pour le test SpST est généralement positive si une explication détaillée de l'importance de la technique leur est donnée. L'utilisation de spermatozoïdes humains permet de n'avoir aucune différence d'espèce pouvant potentiellement biaiser l'interprétation des tests utilisant des gamètes d'origine animale précédemment évoqués. De plus, aucune matière biologique d'origine animale ne peut être introduite dans les laboratoires d'AMP. Ainsi, si le test de repro-toxicité est réalisé en dehors du laboratoire avec les gamètes animales, il ne sera pas un reflet correct des conditions du laboratoire, comme la qualité de l'air entre autres (18,19,67). Enfin, ce type de test est décrit comme présentant une sensibilité supérieure par rapport au MEA pour la détection d'une substance embryo-toxique (67,68).

L'objectif de ce test SpST est de quantifier la survie spermatique, après une incubation de durée déterminée en présence des substances ou consommables à évaluer. L'utilisation d'un sperme aux paramètres fonctionnels normaux (normes de l'OMS) est obligatoire afin de ne pas

créer d'interférences et de biais dans l'interprétation des résultats. Le sperme est préparé selon une technique utilisant un gradient de densité ou une technique « swim-up » (migration ascendante des spermatozoïdes), suivant les auteurs. La suspension spermatique obtenue est supplémentée avec un milieu de culture approprié pour permettre une survie spermatique et d'ajuster la concentration au niveau souhaité (8,18,67). Comme le MEA, le HSSA est plus sensible en l'absence d'albumine (67,68). Ceci est à corréler avec l'étude de Makler *et al*. prouvant que l'ajout d'une source protéique dans le milieu de culture spermatique maintient la mobilité pendant des durées d'incubation prolongées *in vitro* (69). De la même façon, Parinaud *et al*. ont montré dans leur étude qu'après 24h d'incubation, la mobilité spermatique est diminuée dans un milieu sans protéine en comparaison d'un milieu supplémenté en protéines (70). L'albumine présente des propriétés de quenching de radicaux libres de par sa structure chimique comprenant 17 ponts disulfures. Ainsi, la peroxydation lipidique membranaire du spermatozoïde est minimisée en présence d'albumine, qui par ailleurs chélate les éventuels toxiques présents dans le milieu. Claassens *et al*. proposent donc de ne pas rajouter d'albumine dans le milieu de culture lors du HSSA de façon à optimiser la sensibilité du test (67).

Le SpST compare la mobilité obtenue en présence des produits à tester avec la mobilité obtenue en parallèle dans un test de contrôle, où les spermatozoïdes n'ont pas été soumis à une incubation en présence des potentiels toxiques. Un index de survie est alors calculé (8,18,67).

$$SpST\ index = \frac{\%\ de\ spermatozoïdes\ mobiles\ progressifs\ dans\ le\ tube\ test}{\%\ de\ spermatozoïdes\ mobiles\ progressifs\ dans\ le\ tube\ contrôle}$$ (8,17,18,68)

Cet index permet de conclure quant à la repro-toxicité du produit testé et sa possible utilisation au laboratoire d'AMP :

- Si SpST index < 0,85 : le produit testé (ou le lot de produit testé) est considéré repro-toxique et interdit d'utilisation au laboratoire d'AMP ;
- Si SpST index > ou = 0,85 : le produit testé (ou le lot de produit testé) est considéré comme apte à être utilisé au laboratoire d'AMP (8,18,68).

Il est à noter que le test n'est validé que si plus de 70% des spermatozoïdes du tube contrôle présentent une mobilité progressive après 4 jours d'incubation (8). Par ailleurs, la valeur seuil du SpST index indiqué n'est pas utilisée par tous les auteurs : Claassens *et al*. utilisent une valeur seuil de 0,75 (67).

Claassens *et al*. ont cherché à optimiser les conditions de réalisation du HSSA pour maximiser la sensibilité de ce test, en répondant à différentes questions pratiques comme l'ajout ou non d'albumine dans le milieu, les variations liées au sperme donneur, la concentration spermatique ou encore le temps d'incubation. Leur étude montre notamment que les variations liées à l'utilisation de différents spermes frais de donneurs n'influencent pas le résultat du test (ceci étant différent pour l'utilisation de sperme cryoconservé). Par ailleurs, la concentration spermatique utilisée influence significativement l'index de survie spermatique uniquement en l'absence d'albumine. En effet, le nombre de molécules toxiques se fixant par spermatozoïde est plus important si la concentration en spermatozoïdes est faible et en l'absence d'albumine,

d'où une décroissance plus importante des index de survie. Dans ces conditions, si l'opérateur choisit de ne pas rajouter d'albumine pour augmenter la sensibilité du test, Claassens *et al*. préconisent d'utiliser une concentration standardisée de spermatozoïdes pour obtenir des résultats comparables (67).

Concernant le temps d'incubation, le HSSA peut se réaliser sur différentes durées d'incubation (8,19,67). Fishel *et al*. ont montré que des spermatozoïdes humains issus de patients normospermes peuvent être laissés à température ambiante pendant des périodes relativement importantes, variant de 90 à 250 heures selon les individus (71). L'étude de Mansour *et al*. montre qu'après 2,9 jours en moyenne, 25% des spermatozoïdes mobiles d'une préparation spermatique perdent leur mobilité (72). Certains auteurs préconisent alors une durée d'incubation de 4h ou de 24h à 96h (67). Critchlow *et al*. ont choisi une incubation longue de 4 jours pour favoriser une sensibilité maximale aux éventuels toxiques en faible concentration, tout en conservant une mobilité correcte et valide pour le tube contrôle (8). Claassens *et al*. ont testé différentes durées d'incubation de 2h, 4h, 6h, 8h, 24h et 48h. Le résultat de leur étude montre finalement qu'au bout de 2 à 3h d'incubation, la décroissance rapide du SpST index permet de distinguer les substances toxiques pour les gamètes (en l'absence d'albumine) (67). Aux Etats-Unis, l'American Association of Bioanalysts (AAB), principal fournisseur de tests de repro-toxicité pour les laboratoires d'AMP, recommande une durée de 48h pour une qualification précise des milieux de culture embryonnaire (61). Le temps d'incubation dépend aussi de la substance, milieu de culture ou consommable testé, et ce temps doit être en adéquation avec l'utilisation en pratique du matériel en question. Ainsi, un milieu de culture reste en pratique en contact au moins 24h avec une préparation spermatique ou des embryons humains, et devra donc être testé sur une période d'incubation d'au moins 24h. Pour des gants de laboratoire, la durée d'incubation peut être de 10 minutes, 30 minutes ou encore 1 heure, car en pratique le contact étroit entre gamètes ou embryons humains et gants est limité lors de la procédure d'AMP (8,67,68).

Hossain *et al*. ont étudié la meilleure durée d'incubation de ce test pour l'évaluation des milieux de culture embryonnaire, en prenant en compte que 48h représentait une durée trop longue dans le cadre de l'optimisation des procédés au laboratoire. Leur conclusion est que les résultats du test à 24h sont les mêmes que ceux obtenus après 48h d'incubation et permettent donc de gagner du temps pour valider l'utilisation d'un lot de milieu de culture (63).

Iemmolo *et al*. ont travaillé sur un HSSA modifié en utilisant un sperme non préparé, non lavé et incubé à température ambiante pour 6h. Sans milieu nutritif ajouté comme dans le traditionnel HSSA, les spermatozoïdes seraient plus rapidement sensibles à un toxique selon les auteurs. Leur étude prouve que cette procédure permet d'obtenir un test rapide et sensible pour la détection des produits repro-toxiques (17).

Malgré ses différents avantages, le HSSA comporte certaines limites. En effet, il ne permet pas forcément de détecter toutes les toxines pouvant affecter le développement embryonnaire. Ainsi, le spermatozoïde étant plus résistant que l'embryon, il est difficile de conclure à une

innocuité totale du produit sur l'embryon si celui-ci n'a pas montré d'effet sur la mobilité spermatique (22).

I.5. Tests en développement

L'utilisation d'embryons humains étant formellement interdite car contraire aux principes d'éthique, Gardner *et al*. préconisent la réalisation de tests de repro-toxicité sur des ovocytes humains provenant de donneuses ou de patientes jeunes. Ainsi, l'utilisation de ce type d'ovocytes permettrait d'évaluer, en conditions réelles, si un milieu de culture est approprié pour une utilisation au laboratoire d'AMP (22).

En revanche, une limite évidente d'un tel test serait l'obtention d'un nombre suffisant d'ovocytes pour une réalisation hebdomadaire de ce test en tant que CQ à part entière du laboratoire.

I.6. Produits testés lors des tests de repro-toxicité en AMP

La plupart des firmes fabriquant des consommables à destination des laboratoires d'AMP certifient leurs produits non repro-toxiques en réalisant un test MEA et/ou un « limulus amoebocyte lysate endotoxin test » (18). Auparavant, différents auteurs dont Scott *et al*. ont utilisé ces tests dans leurs protocoles de recherche pour prouver l'absence d'endotoxines dans les produits utilisés pour les préparations spermatiques (35). Les endotoxines bactériennes, macromolécules complexes libérées après la lyse de bactéries Gram négatif, ont été associées à des phénomènes de fragmentation embryonnaire, cytoplasmes granuleux ou irrégularités membranaires. Elles impactent l'ensemble des organites mais ne semblent pas associées à une diminution du taux de fécondation et de clivage précoce. En revanche, la fragmentation induite à un taux faible de 1 ng/mL peut être cause, par la suite, d'échec de grossesse (73,74). Le « limulus amoebocyte lysate endotoxin test », utilisé par Fishel *et al*. (73) et Snyman and Van der Merwe (74) pour prouver les phénomènes cellulaires induits évoqués ci-dessus, est un test de détection d'endotoxines utilisant un extrait aqueux d'amoebocytes de Limules (*Limulus polyphemus*), et basé sur une réaction biologique enzymatique : une substance chromogène est convertie par un système enzymatique de ces amoebocytes, activé par la présence d'endotoxines. L'intensité de détection est corrélée par des courbes de référence avec un taux d'endotoxines (75). La présence d'endotoxines dans les milieux de culture peut s'expliquer par l'utilisation d'eau lors du procédé de fabrication de ces milieux. Même stérilisée, l'eau peut malgré tout contenir des endotoxines, nocives pour les embryons et gamètes humains à un taux relativement faible. Nagata *et al*. ont notamment réalisé une étude pour définir un seuil tolérable d'endotoxines dans les milieux de culture destinés aux protocoles d'AMP (22,75).

La combinaison de ces tests réalisés par les industriels avec un test HSSA « maison » réalisé au laboratoire d'AMP avant l'utilisation d'un lot de consommables ou autres produits permet donc d'augmenter la sensibilité de détection d'un effet repro-toxique potentiel (18,67). Certains auteurs dont Gardner *et al*. préconisent d'ailleurs plusieurs tests différents pour qualifier de non repro-toxique un milieu de culture ou consommable de laboratoire (22,68). Par

ailleurs, De Jonge *et al*. ont démontré dans leur étude que ce test HSSA présente une reproductibilité telle que différents laboratoires obtiennent des résultats comparables (19). Ainsi, si tous les laboratoires testent systématiquement les produits à leur réception dans la structure et avant leur utilisation, et si une anomalie est constatée avec un lot de produits, une déclaration au fabricant permettrait à ce dernier de retirer le lot dangereux et de réévaluer au besoin la composition ou le procédé de fabrication du consommable repro-toxique (8,18,19). Selon cette théorie, tous les lots de produits et consommables utilisés au laboratoire d'AMP devraient être testés avant leur utilisation.

Les études exposant des tests réalisés sur différents milieux de culture existent en quantité dans la littérature (33,34,37,55,56,63). Par ailleurs, les consommables sont aussi évalués (76). Par exemple, Lierman *et al*. ont étudié la repro-toxicité de différents types de gants utilisés lors des procédures d'AMP par test MEA et HSSA, assurant ainsi un double contrôle qualité. Leur étude met notamment en évidence la toxicité de certains types de gants, à proscrire lors des procédures en AMP (68). Critchlow *et al*. expliquent que les éléments en plastique des boites de culture sont souvent traités avec une substance de revêtement pour éviter tout contact entre les cellules et les substrats plastiques et pour favoriser l'attachement cellulaire. Cependant si cette substance de revêtement vient à s'éroder ou qu'un défaut de fabrication existe, les matières plastiques sont directement en contact avec les cellules (8).

En pratique, dans leur étude prospective de 4 ans, Nijs *et al*. font le bilan de l'utilisation du test SpST en routine pour déterminer la repro-toxicité potentielle de tous les consommables et autres équipements de laboratoire en contact avec les embryons humains ou les gamètes, utilisés au laboratoire d'AMP de Genk (Belgique) (18). La diversité des produits testés est telle que 36 types de produits ont été analysés en 350 tests SpST (chaque lot étant vérifié dès sa réception au laboratoire). Les tests SpST ont été réalisés selon l'usage spécifique à chaque consommable ou équipement. Ainsi, la méthode d'exposition et le temps d'exposition de la suspension spermatique « test » varient suivant le produit testé (18). Le tableau suivant résume la plupart des produits testés.

Tableau 1 : Produits testés par test SpST par Nijs *et al*. (d'après (18))

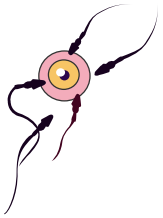
<table>
<tr><th>Produit</th><th>Méthode d'exposition</th><th>Temps d'exposition</th></tr>
<tr><td>Gants chirurgicaux</td><td rowspan="2">0,5 x 0,5 cm dans la suspension de sperme</td><td rowspan="7">30 minutes</td></tr>
<tr><td>Préservatifs (sonde d'écho-guidage)</td></tr>
<tr><td>Pipettes</td><td rowspan="5">10 x aspiration/refoulement de la suspension de sperme</td></tr>
<tr><td>Cathéters</td></tr>
<tr><td>Seringues et filtres</td></tr>
<tr><td>Aiguilles et guide d'aiguilles</td></tr>
<tr><td>Tubes en latex (ponction ovocytaire)</td></tr>
<tr><td>Pipettes pour embryons, pipettes d'ICSI, pipettes de</td><td>Remplies avec la suspension spermatique</td><td>24 heures</td></tr>
</table>

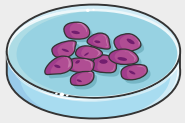
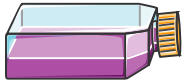
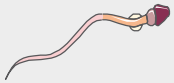
Produit	Méthode d'exposition	Temps d'exposition
holding, pipettes de décoronisation		
Paillettes de cryoconservation et pointe de remplissage		
Hystéroscope	Dans la suspension spermatique	30 minutes
Tubes	Remplis avec 0,5 mL de suspension spermatique	24 heures et 96 heures
Boites de culture (fond et couvercle)	En contact en surface avec la suspension spermatique	1h
Flacons (stockage milieux de culture et huile)		
Tulipe de recueil spermatique et couvercle		

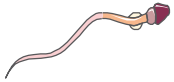
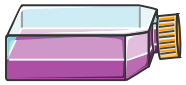
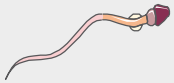
Au final, 28 tests SpST sur les 350 réalisés mettaient en évidence une repro-toxicité des équipements testés, conduisant à leur interdiction d'utilisation au laboratoire d'AMP de Genk. Cette toxicité pourrait être en lien avec leurs compositions chimiques, comportant soit du silicone (intérieur du couvercle de tulipe de recueil), soit du latex, du nitrile ou du polyisoprene (gants) soit du PVC (boites de culture). Nijs *et al.* évoquent aussi la possibilité d'une toxicité induite par la présence d'endotoxines bactériennes (hypothèse corroborée par l'étude de Morimoto *et al.*), provenant des étapes de production, de packaging, ou encore de transport des consommables testés. Les fabricants de ces produits en ont été informés (18,77).

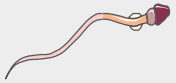
I.7. Synthèse des tests utilisés en AMP

Tableau 2 : Caractéristiques des principaux tests de repro-toxicité utilisés en AMP

Nom	Origine	Type cellulaire	Description	Avantages	Inconvénients	Publications
Follicle BioAssay (FBA)	Souris 	Gamète : ovocytes 	Impact du composé étudié sur la folliculogenèse et la maturation ovocytaire *in vitro*	➢ Évaluation précise repro-toxicité féminine (folliculogenèse ou ovogenèse) avec potentiel mécanisme d'action toxique	➢ Logement d'une colonie de souris ➢ Nombre d'animaux ➢ Expérience et savoir-faire +++ ➢ Chronophage ➢ Coût	Van Wemmel *et al.* (27) Brown *et al.* (28) Cortvrindt *et al.* (29) Sun *et al.* (30) Nogueira *et al.* (31)
In Vitro Fertilization assay (IVF)		Gamète (ovocyte) puis embryon formé 	Impact du composé étudié sur la fécondabilité des ovocytes exposés à long terme (continuité du FBA)	➢ Étude précise de l'influence sur le processus de fécondation		Lemeire *et al.* (26) Hu *et al.* (32)
Mouse Embryo Assay (MEA)		Embryons 	Impact du composé étudié sur l'embryogenèse	➢ Qualification directe d'une embryo-toxicité ➢ Gold standard historique de l'évaluation de repro-toxicité en AMP	➢ Idem FBA et IVF ➢ Variabilité inter-animale, inter-opérateur et inter-test ➢ Biais d'espèce (embryons murins plus résistants qu'embryons humains ?)	Quinn *et al.* (7,33) Parinaud *et al.* (21) Gardner *et al.* (22,46) Ackerman *et al.* (34) Scott *et al.* (35) McDowell *et al.* (36) Tucker *et al.* (37) Van Merris *et al.* (38) Davidson *et al.* (39) Gorrill *et al.* (40)

Nom	Origine	Type cellulaire	Description	Avantages	Inconvénients	Publications
						Fukuda *et al.* (41) George *et al.* (42) Esterhuizen *et al.* (43) Randall *et al.* (44)
Embryo implantation assay		Embryons 	Impact du composé étudié sur le taux d'implantation embryonnaire	➢ Unique méthode évaluant le processus d'implantation	➢ Test historique surtout réalisé pour perfectionner les techniques de transfert embryonnaire	Sarvari *et al.* (48) Chin *et al.* (47)
Embryonic Stem cell Test (EST)		Cellules souches embryonnaires murines (ES-D3) 	Impact du composé étudié sur l'organogenèse précoce	➢ Pas de sacrifice animal ➢ Lignée cellulaire continue disponible ➢ Étude d'une embryo-toxicité tardive post-implantation	➢ Précision de l'atteinte ➢ Étude limitée à un seul type cellulaire (cardiomyocytes) ➢ Réalisation pratique et savoir-faire +++	Sogorb *et al.* (25) Lemeire *et al.* (26) De Jong *et al.* (49–51) Chen *et al.* (52)
Hybridoma cells		Cellules d'hybridome 1E6 	Impact du composé étudié sur la croissance et la multiplication cellulaire	➢ Test simple ➢ Reproductibilité	➢ Compétences en culture cellulaire requises ➢ Coût du maintien d'une activité de culture cellulaire	Bertheussen *et al.* (53)
Rabbit sperm motility test	Lapin 	Gamète : Spermatozoïdes 	Impact du composé étudié sur les paramètres de mobilité spermatique après incubation 6h en présence du produit testé	➢ Technique rapide ➢ Coût peu élevé ➢ Pas de sacrifice animal ➢ Homogénéité du sperme de lapin ➢ Disponibilité +++	➢ Aucune information sur la toxicité sur l'embryogenèse ➢ Logement d'une colonies de lapin	Young *et al.* (54)

Nom	Origine	Type cellulaire	Description	Avantages	Inconvénients	Publications
Hamster sperm motility test	Hamster 	Gamète : Spermatozoïdes 	Impact du composé étudié sur les paramètres de mobilité spermatique après incubation 6h en présence du produit testé	➢ Sensibilité ➢ Faible nombre de hamsters requis	➢ Aucune information sur la toxicité sur l'embryogenèse ➢ Logement d'une colonie de hamsters ➢ Disponibilité des hamsters	Rinehart *et al.* (20) Gorrill *et al.* (40) Esterhuizen *et al.* (43) Stewart-Savage *et al.* (55) Bavister *et al.* (56) Reed *et al.* (57) Chan *et al.* (58)
Oocyte comet assay		ADN cryoconservé d'ovocyte 	Impact du composé étudié sur l'ADN par évaluation de sa fragmentation (Principe dérivé du COMET assay)	➢ Test rapide ➢ Sensibilité +++ ➢ Coût peu élevé ➢ Test cycle cellulaire indépendant ➢ Détection d'effets directs sur l'ADN	➢ Nécessité d'un microscope à fluorescence + logiciel associé	Chan *et al.* (58)
Lignée cellulaire CHO KI		Cellules ovariennes CHO KI 	Impact du composé étudié sur l'attachement et la croissance cellulaire	➢ Sensibilité	➢ Compétences en culture cellulaire requises ➢ Coût d'une culture cellulaire ➢ Test chronophage	Ray *et al.* (59)
Bull sperm motility test	Taureau 	Gamète : Spermatozoïdes 	Impact du composé étudié sur les paramètres de mobilité spermatique après incubation en présence du produit testé	➢ Homogénéité du sperme bovin ➢ Utilisation possible d'aliquots cryoconservés ➢ Reproductibilité +++ ➢ Disponibilité	➢ Pas d'extrapolation possible à l'Homme (sélection des taureaux au fil des siècles) ➢ Sensibilité réduite	Kemp *et al.* (60) Hinsch *et al.* (61)

Nom	Origine	Type cellulaire	Description	Avantages	Inconvénients	Publications
Bovine hemizona assay			Impact du composé étudié sur l'interaction gamétique	➢ Évaluation de l'intégrité acrosomale, de la capacité à effectuer une réaction acrosomique et de la capacité de liaison spermatozoïde/ovocyte	➢ Technique de coloration en fluorescence ➢ Nécessité d'un microscope à fluorescence	Hinsch *et al*. (61)
Human Sperm Survival Assay (HSSA)	Homme 	Gamète : Spermatozoïdes 	Impact du composé étudié sur la mobilité spermatique après incubation en présence du produit testé	➢ Facilité d'intégration dans la procédure qualité du laboratoire ➢ Test très peu coûteux ➢ Rapide ➢ Facile ➢ Sensible ➢ Fiable ➢ Disponibilité +++ dans les laboratoires d'AMP ➢ Pas de biais d'espèce ➢ Test réalisable au laboratoire d'AMP	➢ Pas de détection de toutes les toxines affectant l'embryon (spermatozoïde plus résistant que l'embryon)	Critchlow *et al*. (8) Iemmolo *et al*. (17) Nijs *et al*. (18) De Jonge *et al*. (19) Gardner *et al*. (22) Edwards *et al*. (1) Hossain *et al*. (63) Claassens *et al*. (67) Lierman *et al*. (68) Makler *et al*. (69) Parinaud *et al*. (70) Fishel *et al*. (71) Mansour *et al*. (72)
Limulus Amoebocyte Lysate endotoxin test (LAL)	Limule 	Extrait aqueux d'amoebocytes de limules (*Limulus polyphemus*) 	Détection d'endotoxines bactériennes	➢ Seul test permettant de détecter spécifiquement une présence de toxines bactériennes ➢ En combinaison avec un autre test de repro-toxicité, sensibilité +++	➢ Détection d'une toxicité non inhérente au composé testé	Scott *et al*. (35) Fishel *et al*. (73) Snyman *et al*. (74) Nagata *et al*. (75)

II Les produits de bionettoyage au laboratoire d'AMP

II.1. Généralités sur les produits de désinfection

II.1.1. Réglementation et définitions générales

La directive Biocide 98/8/CEE de 1998 transposée en droit français (décret 2004-187 du 26 février 2004, Code de l'environnement, articles L522-14 à 19) a permis de préciser la classification des produits désinfectants et antiseptiques en fonction de leurs applications :

- Désinfection pour surfaces inertes destinée à la maîtrise des risques microbiologiques liés à l'environnement : les désinfectants employés sont des biocides si les surfaces concernent des locaux ou des surfaces externes d'équipements médicaux ou non médicaux. Si les désinfectants sont destinés à des dispositifs médicaux nécessitant d'être traités pour être utilisés, alors ce sont des dispositifs médicaux (DM) ;

- Désinfection des tissus vivants (mains, peau saine) : les désinfectants employés sont des biocides. Avant cette directive, ces produits faisaient partie des antiseptiques ;

- Antisepsie des tissus vivants (peau lésée, muqueuses, champ opératoire, peau du nouveau-né) : il ne s'agit pas de désinfectants mais d'antiseptiques qui ne relèvent pas de la réglementation Biocide ou dispositifs médicaux. Les antiseptiques sont des médicaments avec une autorisation de mise sur le marché (AMM) de type médicament selon deux directives européennes 65/65/CEE et 92/73/CEE ;

- Les produits d'hygiène ne revendiquant pas d'activité antiseptique ou désinfectante rentrent dans la catégorie des cosmétiques avec une réglementation spécifique (directive 76/768/CEE du 27 juillet 1976 applicable jusqu'en 2013 puis règlement CE du 30 novembre 2009) (78).

Dans le domaine médical, deux grandes catégories de désinfectants se retrouvent : biocide ou dispositif médical selon les revendications du fabricant. Dans chacun des cas, le désinfectant doit répondre à la réglementation européenne spécifique liée à son statut. La norme NF EN 14885 spécifie les normes européennes auxquelles les produits doivent être conformes afin de soutenir les revendications d'activité microbicide (ex : Norme EN 13727 obligatoire pour les produits permettant une désinfection des surfaces avec action mécanique prouvant une activité bactéricide) (78).

II.1.2. Choix d'un produit de bionettoyage

En milieu hospitalier, un produit de bionettoyage est choisi pour répondre à un cahier des charges préalablement établi. Le choix prend notamment en compte les aspects suivants : indications du produit, le ou les principes actifs souhaités ainsi que le ou les adjuvants souhaités, le spectre d'action du produit, le niveau de désinfection souhaité, la présentation, le temps de contact maximum souhaité, la toxicité du produit (avec notamment l'émergence de pathologies

respiratoires comme l'asthme en lien avec l'utilisation de produits de bionettoyage (79)) et la liste des matériaux incompatibles avec le produit (78).

II.2. Produits de bionettoyage et AMP

Un bionettoyage rigoureux du laboratoire d'AMP est bien évidemment obligatoire pour limiter la contamination microbienne, nocive pour les gamètes et les embryons mais aussi pour assurer la sécurité des praticiens du laboratoire (15). Les modalités du bionettoyage du laboratoire sont définies avec le comité en charge de la lutte contre les infections nosocomiales (CLIN) ou son équivalent (13). La procédure générale de nettoyage tient compte des produits, de leur mode d'emploi, des surfaces, du temps et du nombre de personnes nécessaires à la réalisation de cet entretien. Chaque laboratoire choisit ainsi la procédure la plus adaptée à son environnement et son activité. Enfin, un contrôle pour vérifier la biodécontamination des différentes zones du laboratoire est effectué régulièrement par des prélèvements de surface (à l'aide de boites de Pétri entre autre) (13). Dans leur laboratoire, Esteves et Bento ont défini une liste de tâches quotidiennes de bionettoyage : nettoyage de toutes les surfaces de travail, des sols, de l'équipement, des bouches d'aération, des portes, des casiers et vidange des déchets. Les incubateurs sont nettoyés de façon mensuelle. Annuellement, les pièces du laboratoire sont désinfectées avec une solution à 2% d'hypochlorite de sodium. Tous les 6 mois, des prélèvements microbiologiques à l'aide de boites de Pétri (moisissures et bactéries) sont réalisés dans chaque pièce du laboratoire (24).

L'arrêté du 3 août 2010 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation précise notamment que les produits de bionettoyage utilisés dans les laboratoires d'AMP sont choisis parmi ceux ne présentant pas de toxicité connue sur les gamètes, les tissus germinaux ou les embryons aux doses employées (13). En effet, de part leur composition chimique, les produits bionettoyants peuvent contenir des composés comme des terpènes utilisés en tant que parfums (ex : limonène) (80). Ces composés appartiennent à la grande famille des COV et peuvent impacter directement ou indirectement l'embryon, après réaction avec des molécules atmosphériques donnant naissance à des Aérosols Organiques Secondaires (AOS) (81). Les travaux de Singer *et al*. montrent que même dilués, l'utilisation de produits bionettoyants peut s'accompagner d'un dégagement de COV (moins important tout de même) (80). Une explication détaillée est donnée dans la partie relative aux COV (cf ci-après).

II.3. Enquête BLEFCO

Un état des lieux des pratiques de bionettoyage dans les laboratoires d'AMP de France a été réalisé à l'aide d'un questionnaire envoyé par mailing-liste à l'ensemble des adhérents de l'association des Biologistes des Laboratoires d'Étude de la Fécondation et de la Conservation de l'œuf (BLEFCO). Chaque centre participant devait compléter un tableau mentionnant : le nom du centre, chaque produit utilisé dans le laboratoire, l'usage fait de chaque produit, et d'éventuelles remarques. Un tableau de synthèse a été complété suite aux retours par mail des différents centres participants.

Tableau 3 : État des lieux des pratiques de bionettoyage dans les centres d'AMP de France et à Bruxelles

Centre	Produit utilisé	Usage	Remarques
Centre d'AMP du CHRU de Nancy	1. Aniosurf®	Décontamination de toutes les surfaces dont sols, paillasses, étuves	Pour les étuves, après application du produit et séchage, un rinçage visant à éliminer toute trace de produit est effectué
	2. Salvanios®	Décontamination par trempage (portoirs, matériel pour CCTO,…)	
	3. Eau stérile	Décontamination du plan de travail entre deux transferts embryonnaires	Toute projection entraine l'utilisation de l'Aniosurf®
Centre d'AMP du CHU de Clermont	1. Oosafe®	Décontamination après chaque manipulation des paillasses et des hottes	
	2. DD Désinfectant- Détergent (ANIOS)	Désinfection 2 fois par an complète des paillasses, hottes, petit matériel et centrifugeuses	
	3. Eau stérile ppi	Décontamination des paillasses en cas de contamination accidentelle	
Centre d'AMP du CHU de Créteil	1. Oosafe® ND	Décontamination des paillasses et des étuves	
	2. Ethanol 70%	Décontamination des paillasses, et des étuves lors des fermetures du laboratoire (3x/an)	
	3. Vapeur d'eau	Sols	

Centre	Produit utilisé	Usage	Remarques
Centre d'AMP de La Rochelle	1. Oosafe®	Sols et Surfaces	Sans rinçage (Pas d'autres produits)
Centre PMA du CHIREC (Bruxelles, Braine BRAINE L'ALLEUD)	1. Oosafe® Disinfectant for CO2 Incubators and Laminar Flow Hoods Marque SPARMED, REF. OODIH-1000	Décontamination des incubateurs (1x/mois), flux laminaires (entre chaque acte et début/fin journée), surfaces	MEA et HSSA TESTED, For IVF LABORATORY Tested
	2. Fertisafe® "Embryo safe disinfectant spray" Marque: RI REF: 7-90-305	Nettoyage de toutes les surfaces du laboratoire (plans de travail, chaises, meubles, microscopes, câbles, ordinateurs, extérieur des incubateurs, centrifugeuses (1x/semaine)	
	3. Oosafe® Surface Disinfectant	Nettoyage des sols (1 sur deux) et nettoyage des murs/plafonds (1x/6 mois)	
	4. Tristel Fuse for Surfaces®	Nettoyage des sols (1 sur deux)	
Centre d'AMP du CHU de REIMS	1. Surfanios®	Décontamination de toutes les surfaces dont sols, paillasses, étuves	
	2. Salvanios®	Décontamination par trempage (portoirs, …)	
	3. Ethanol 95%	Décontamination des platines de microscopes	Non quotidienne car pas d'huile (pas d'IMSI)
	4. Eau stérile	Décontamination du plan de travail entre deux transferts embryonnaires	Toute projection entraine l'utilisation de Surfanios®

Centre	Produit utilisé	Usage	Remarques
Centre d'AMP de MARSEILLE CONCEPTION	1. DDN9® (DUTSCHER)	Désinfectant neutre pour incubateurs et étuves	Trempage des éléments démontables de l'incubateur + intérieur de l'incubateur avec lingette imbibée de DDN9 + rinçage à l'eau filtrée
	2. Aniosurf®	Nettoyage des sols	
	3. Surfa'Safe®	Mousse de désinfection des plans de travail, paillasses, platines de microscopes, vis de microscopes, poignées de portes des incubateurs	
Centre d'AMP du CHRU de Nîmes	1. Déterganios®	Nettoyage de toutes les surfaces dont sol (quotidien), paillasses (1 fois par mois), incubateurs (semestriel, avant fermetures)	
	2. Surfanios®	Décontamination de toutes les surfaces dont sols (1 fois par mois), paillasses (quotidien)	
	3. Oosafe®	Appliqué à la fin du nettoyage 3 temps mensuel et semestriel	
	4. Eau	Rinçage entre déterganios® et surfanios® (nettoyage 3 temps)	
	5. Ethanol 70%	en fin de nettoyage des incubateurs (semestriel, avant fermetures)	
Centre d'AMP de NATECIA LYON	1. Oosafe® Surface disinfectant (SPARMED)	Sols uniquement	

Centre	Produit utilisé	Usage	Remarques
	REF 00DSF-02000		
	2. Oosafe® Disinfectant for CO2 Incubators and Laminar Flow Hoods (SPARMED) REF 00DIH-1000	Décontamination de toutes les surfaces, paillasses, étuves, platines, microscopes	
	3. Ethanol 70%	Nettoyage des traces d'huile sur platines et paillasses	
Centre d'AMP du CHU de Nantes	1. Oosafe®	Décontamination de toutes les surfaces dont sols, paillasses, étuves	Rinçage à l'eau des paillasses
	2. Eau stérile	Nettoyage des postes de travail entre deux patients	
Centre d'AMP du CHU de Poitiers	1. Aniosurf®	Décontamination de toutes les surfaces dont sols	
	2. Surfa'safe®	Paillasses, étuves	Pour les étuves, après application du produit et séchage, un rinçage visant à éliminer toute trace de produit est effectué
Centre d'AMP d'Annemasse	1. Oosafe®	Paillasses, matériels, hottes, étuves	
	2. Surfanios®	Sols	

Centre	Produit utilisé	Usage	Remarques
	3. Aniosyme® et Stéranios® 2%	Corps de pompe	
	4. Aniosgel®	Désinfection des mains	
Centre d'AMP du CHRU de Lille	1. Aniosurf®	Décontamination de toutes les surfaces dont sols, paillasses, étuves	Pour toutes les surfaces après application du produit et séchage, un rinçage visant à éliminer toute trace de produit est effectué. (Eau stérile pour hottes et paillasse et étuves)
	2. Salvanios®	Décontamination par trempage (portoirs, matériel pour CCTO,…)	
	3. Ethanol 70%	Décontamination des platines de microscopes en fin de journée (plutôt si besoin et après IMSI mais pas tous les jours)	
	4. Eau stérile	Décontamination du plan de travail entre 2 manipulations (transferts embryonnaires ou lecture de POV et platine des micro-injecteurs…)	Toute projection entraine l'utilisation de l'Aniosurf®
Centre d'AMP de Clamart	1. Surfa'safe®	Décontamination quotidienne des paillasses et PSM en fin de journée	
	2. Surfanios®	Décontamination hebdomadaire des paillasses, dessus des étuves…	

Centre	Produit utilisé	Usage	Remarques
	3. DD Détergent-Désinfectant (ANIOS)	Nettoyage quotidien des sols après avoir utilisé des lingettes attrape-poussières	
	4. Eau stérile	Nettoyage des étuves lors des périodes de fermeture (6x/an)	Les clayettes des étuves sont envoyées en stérilisation à chaque période de fermeture (6x/an)

III Généralités sur les Composés Organiques Volatils (COV)

III.1. Définition

III.1.1. Familles chimiques et sources d'émission

La définition des Composés Organiques Volatils (COV) est décrite dans la Directive européenne du 11 mars 1999, relative à la réduction des émissions de COV dues à l'utilisation de solvants organiques dans certaines activités et installations (82) :

- Un « composé organique » est défini comme tout composé contenant au moins l'élément carbone et un ou plusieurs des éléments suivants : hydrogène, halogène, oxygène, soufre, phosphore, silicium ou azote, à l'exception des oxydes de carbone et des carbonates et des bicarbonates inorganiques (83) ;
- Un « composé organique volatil » correspond à tout composé organique ayant une pression de vapeur de 0,01 kPa ou plus à une température de 293,15 K ou ayant une volatilité correspondante dans les conditions d'utilisation particulière (83).

Une autre définition est donnée dans la Directive 2002/3/CE qui qualifie de COV « tous les composés organiques provenant de sources anthropiques et biogènes autres que le méthane, capables de produire des oxydants photochimiques par réaction avec des oxydes d'azote sous l'effet du rayonnement solaire » (84).

Parmi les grandes familles de COV, on retrouve :

- Les hydrocarbures aliphatiques : hydrocarbures à chaîne carbonée ouverte,
    - Par exemple, le 1,3-butadiène est un alcène formé lors des combustions et classé cancérogène ;
- Les hydrocarbures alicycliques : hydrocarbures cycliques dérivés de la série aliphatique,
    - Cycloalcanes, cycloalcadiènes et terpènes constituent cette sous-famille,
        - Les terpènes sont présents dans beaucoup de produits d'origine végétale et notamment les essences utilisées pour les parfums et produits d'entretien (exemple du limonène) ;
- Les hydrocarbures aromatiques : hydrocarbures formés d'au moins un cycle d'atomes de carbone comme le benzène : on parle alors de noyau aromatique,
    - Lorsque plusieurs noyaux aromatiques rentrent dans la composition d'un composé de ce type, il est alors qualifié d'Hydrocarbure Aromatique Polycyclique (HAP),
        - Plusieurs cancérogènes se trouvent dans cette sous-famille (notamment le benzène). Les carburants comme l'essence comportent une fraction de ces composés et l'essence sans plomb contient par exemple jusqu'à 1% de benzène ;
- Les hydrocarbures substitués : hydrocarbures présentant un atome autre que le carbone et l'hydrogène,

- *Les halogènes* : chloroforme, tétrachlorométhane, chlorure de vinyle, chlorobenzène etc. De nombreuses molécules de cette sous-famille sont classées cancérogènes,
- *Les alcools* : méthanol, éthanol, propanol, butanol etc. La toxicité de ces alcools est généralement faible car leur concentration dans l'atmosphère est peu élevée,
- *Les aldéhydes* : formaldéhyde, acétaldéhyde et acroléine en particulier. Ces molécules sont des composés irritants respiratoires et des cancérogènes reconnus,
- *Les cétones* : acétone, butanone, etc. Ce sont des solvants très largement utilisés dans l'industrie et présents dans certains produits domestiques. Ils sont également des irritants respiratoires,
- *Les éthers et les esters* : éthylène glycol, Ethylene Glycol Methyl Ether (EGME), acétate d'éthylglycol etc. Ces COV sont particulièrement employés dans les peintures, vernis et produits de nettoyage. Les éthers de glycol de bas poids moléculaire sont classés repro-toxiques par l'Union Européenne,
- *Les acides* : acide formique, acide acétique etc.,
- *Les amines, amides et nitriles* : par exemple l'acrylonitrile, monomère de plusieurs polymères de large utilisation industrielle et classée cancérogène (82).

Les sources des COV sont multiples et correspondent à une origine biogénique ou anthropique. Différents secteurs d'activités produisant ce type de composés ont été identifiés par le Centre Interprofessionnel Technique d'Études de la Pollution Atmosphérique (CITEPA) : métallurgie, imprimerie, mécanique, plasturgie, construction automobile, textile, bâtiment, chimie, etc. (85). Les COV sont issus des phénomènes de combustion (fuel, bois, charbon mais aussi tabac) et sont ainsi présents dans les gaz d'échappements de véhicules (car présents dans la composition des carburants) et gaz issus des systèmes de chauffage (donc à taux plus important dans les zones urbaines) (82,86,87). Ces composés peuvent aussi être émis par des appareils spécifiques comme des microscopes ou des écrans de télévision, mais aussi des éléments de notre environnement résidentiel comme des meubles, produits de décoration ou encore matériaux de construction (82,86,88). Certains d'entre eux proviennent de matériaux utilisés pour fabriquer l'appareil, tels que des polymères, des plastifiants, des antioxydants ou encore des agents de démoulage. L'utilisation de peintures et de substances pour les sols comme des adhésifs, mais aussi de certains produits cosmétiques (parfums) provoque une libération de COV (82,86,89). Enfin, de nombreuses procédures de nettoyage s'accompagnent d'une émission de COV en raison des compositions chimiques des produits d'entretien utilisés (80–82,86).

L'environnement intérieur comporte un taux important de COV (82,90). D'après l'inventaire CITEPA de 2013, le secteur résidentiel/tertiaire représente 38% des sources anthropiques d'émissions de COV en 2010 (85). Dans l'environnement intérieur, le nombre de COV et leurs concentrations sont même plus importants que dans l'environnement extérieur (91). Par exemple, une étude réalisée à Nancy par Gonzalez-Flesca *et al*. à la fin des années 90 montre une concentration moyenne en benzène plus importante à l'intérieur (10,8 $\mu g/m^3$) qu'à

l'extérieur (4,4 µg/m^3) des constructions habitables (92). Ces conclusions sont préoccupantes dans la mesure où la population passe plus de temps en intérieur qu'en extérieur (82).

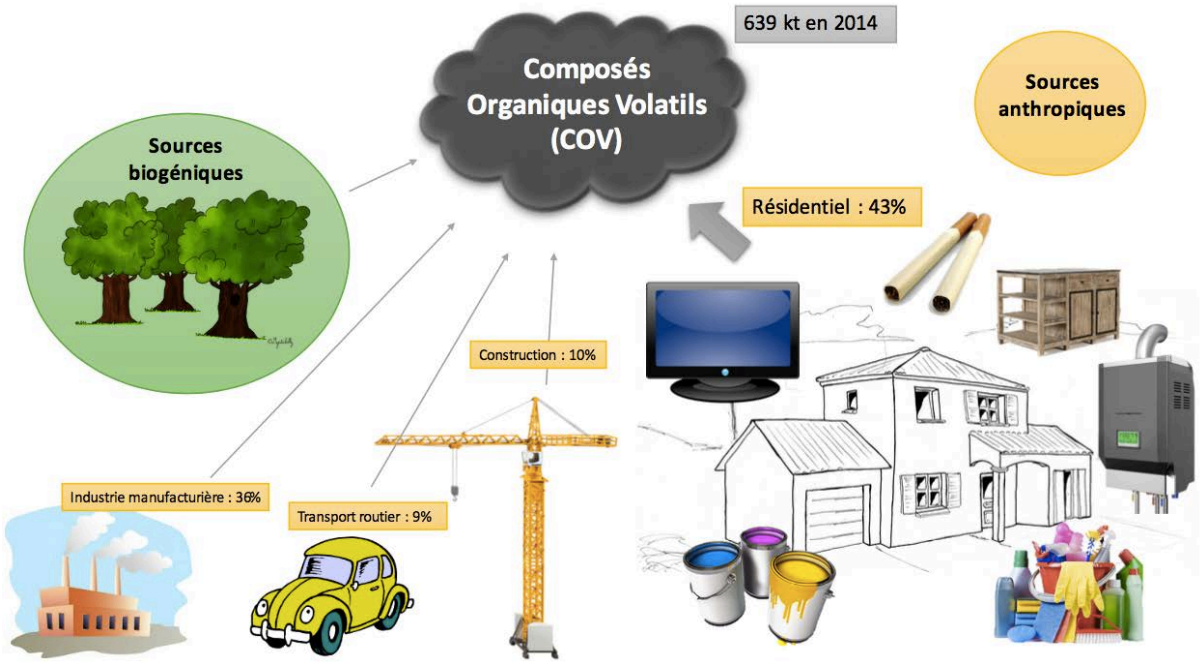


Figure 13 : Sources des Composés Organiques Volatils (COV) (chiffres utilisés : www.citepa.org)

III.1.2. Études toxicologiques

III.1.2.a. Action toxique indirecte

Au niveau troposphérique (à une altitude comprise entre 7 et 10 km), sous l'effet des rayonnements ultra-violets solaires, les COV générés par les activités et matériaux explicités ci-avant engendrent la formation d'ozone et d'autres composés acides ou oxydants (peroxyde d'hydrogène, acide nitrique etc.). Ce sont donc des précurseurs de la pollution photo-chimique ou pollution photo-oxydante (82).

Sans parler des conséquences environnementales sur l'effet de serre, l'ozone formé est un composé irritant respiratoire (pouvant occasionner jusqu'à des crises d'asthme chez des personnes sensibles) et peut réagir dans notre environnement intérieur avec certains COV (limonène présent dans les parfums, acide linoléique provenant du linoléum etc.). Différents composés avec effets néfastes sur la santé humaine peuvent alors se former comme le formaldéhyde, l'acroléine, le peroxyde d'hydrogène, certains acides organiques ou encore des particules fines (particules de diamètre inférieur à 2,5 µm appelées PM 2,5) ou ultrafines (particules de diamètre inférieur à 0,1 µm) (81,82,93–95). L'action toxique de ces Aérosols Organiques Secondaires (AOS) a notamment été démontrée chez le rat où des irritations respiratoires majeures ont été mises en évidence (96). Cicolella met en évidence un problème de santé publique considérable car l'auteur rappelle que de nombreux terpènes sont présents dans les compositions de multiples produits de notre quotidien comme les désodorisants

commerciaux ou les produits de bionettoyage (82,97). Ainsi en cas de période de pollution par l'ozone, la formation d'AOS et ses conséquences seraient majeures, et en particulier dans les endroits où les procédures de nettoyage sont plus fréquemment appliquées par crainte du risque infectieux, comme les crèches ou les maisons de retraite (82).

III.1.2.b. Action toxique directe

Des études toxicologiques ont été menées sur l'animal ou l'Homme pour connaître l'impact des COV mais ces travaux ne décrivent jamais les effets sur l'embryon *in vitro* de ce type de composés (86). L'action toxique directe d'un COV dépend de la molécule en question et correspond principalement à une atteinte respiratoire (majorée par les autres polluants de l'air) ou, pour certains composés comme le benzène, à des effets cancérogènes (82,98,99).

A la fin des années 90, Andersson *et al*. ont publié une revue de la littérature faisant état des différentes méthodes analytiques et concentrations en COV totaux dans l'air de certains buildings, avec pour objectif de déterminer un lien avec différents effets toxiques observés chez l'Homme. Des réactions d'irritations ont été notées. Elles faisaient parties d'un syndrome plus global appelé le syndrome des bâtiments malsains (« sick building syndrome ») caractérisé par des maux de tête ou encore des troubles respiratoires. Cependant, les différentes études n'ont pas montré de lien fort entre taux de COV et ce syndrome (100).

De par leur impact au cours de l'embryogenèse *in utero* et selon l'hypothèse de Barker (101), les COV et autres polluants atmosphériques auraient une influence sur le poids de naissance et un lien potentiel avec la prématurité et des malformations cardiaques congénitales (102,103). La pollution atmosphérique entraine une atteinte respiratoire et générale de la femme enceinte, altérant indirectement le développement fœtal (102). Plus précisément, des études expérimentales et épidémiologiques ont prouvé que certains COV comme les HAP peuvent traverser la barrière placentaire et ainsi être en contact direct avec le fœtus, à l'origine des effets néfastes évoqués (104–106). Au niveau moléculaire, ces composés pourraient présenter des effets anti-oestrogéniques ou se lier au récepteur nucléaire Aryl hydrocarbon (AhR) et provoquer alors un état inflammatoire, induisant notamment des dommages au niveau de l'ADN et l'activation du phénomène d'apoptose cellulaire (102). De par leur interaction avec des récepteurs aux facteurs de croissance cellulaire, les HAP pourraient perturber l'expansion précoce du trophoblaste, entrainant alors notamment une altération de l'implantation et de la placentation et donc une réduction des échanges en nutriments et oxygène avec le fœtus (107). Par la suite, en période post-néonatale, les COV sont aussi incriminés dans une mortalité d'origine respiratoire, notamment en raison de la sensibilité des nouveaux-nés prématurés présentant une immaturité pulmonaire (108).

Au niveau moléculaire, l'action toxique des COV en général s'explique par l'induction de phénomènes de stress oxydatif (102). De manière générale, les COV et particules ultra-fines de la pollution atmosphérique se retrouvent largement au niveau pulmonaire et peuvent échapper à la phagocytose des macrophages alvéolaires (ceci expliquant leur impact sur d'autres organes après translocation extra-pulmonaire) (109). Cette concentration en COV au niveau de l'épithélium respiratoire conduit à un afflux de cellules immunitaires et à une très

large sécrétion cytokinique, à l'origine d'un état inflammatoire majeur avec formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (110,111). En cas de déplétion concomitante en glutathion induite par les COV, les dommages provoqués par ce stress oxydatif seraient très importants (102).

Les organismes vivants à l'instar des mammifères sont relativement protégés des effets néfastes des COV ou des toxiques atmosphériques par leur système immunitaire, digestif mais aussi par la barrière épithéliale. Dépourvus de ces différentes protections, les ovocytes et embryons *in vitro* sont particulièrement sensibles à l'action des COV (86,112,113).

III.2. Méthodes de dosage

Il est possible de déterminer les concentrations de COV en extrayant ces composés à l'aide de milieux de filtration fixes tels que le charbon actif et le permanganate de potassium. Il est néanmoins plus approprié de quantifier les COV en utilisant un système de capture sous vide et un régulateur de débit (86).

Un échantillon d'air peut être capté au moyen d'une pompe calibrée contenant du dioxyde de soufre et un milieu adsorbant pour les COV à base de charbon actif. Un autre milieu adsorbant de type Tenex, à base de polymères poreux issus de l'oxyde de 2,6-diphenyl-*p*-phenylene, est une alternative au charbon activé. Après désorption, l'analyse s'effectue ensuite soit par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à un Détecteur d'Ionisation de Flamme (CPG-DIF) ou par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à une Spectrométrie de Masse (CPG-SM) (86,113). Dans l'étude de Cohen *et al*., les boîtes d'échantillonnage en acier inoxydable, préalablement nettoyées chimiquement, ont été remplies pendant une période de 8 heures à un débit contrôlé afin d'obtenir un volume d'échantillon total de 6 L. L'analyse fut réalisée ensuite après désorption selon la méthodologie US EPA Method TO-14 (1984/1988) et correspond à une analyse en CPG-SM (86).

Les mesures courantes de la qualité de l'air intérieur indiquent généralement des concentrations de faible masse moléculaire (benzène, toluène, hexane) de 1 à 15 mg/m^3 d'air. Les hydrocarbures chlorés peuvent également atteindre 1 à 10 mg/m^3 d'air. Il est essentiel de réaliser que les données en laboratoire d'AMP sont présentées en $\mu g/m^3$ d'air, c'est-à-dire 1000 fois moins que les mesures plus conventionnelles de qualité de l'air en mg/m^3 (86). Pour pouvoir réaliser ces dosages, les méthodes analytiques évoquées ci-avant sont d'ailleurs issues de modifications apportées aux procédures de dosages environnementaux des COV pour atteindre une très faible limite de détection (jusque 0,1 ppb dans l'étude de Worrilow *et al*.) (113,114).

Bien que très sensible, et constituant une méthode de référence, le dosage des COV par CPG-SM requiert un équipement sophistiqué et nécessite du temps. D'autres principes analytiques ont ainsi émergé pour permettre un monitorage rapide en temps réel du taux de COV dans l'air, en utilisant des dispositifs électroniques portatifs dotés de capteurs. Ces appareils peuvent détecter des concentrations de l'ordre de parties par million (ppm) et aussi

prédire avec une précision raisonnable la structure moléculaire de COV rencontrés dans l'environnement ou dans les atmosphères closes (24,115). Toutefois, Esteves et Bento estiment qu'une détection encore inférieure, de l'ordre de parties par milliard (*billion* en anglais) (ppb) serait souhaitable dans le cadre du laboratoire d'AMP où de très faibles taux de COV suffisent à impacter les embryons. Les auteurs rappellent également que toutes les méthodes de mesure disponibles sont sélectives et ne peuvent mesurer simultanément tous les COV présents dans une atmosphère. La gamme des méthodes de mesure et des instruments d'analyse est grande et déterminera la sensibilité des mesures ainsi que leur sélectivité ou leurs biais. Ainsi toute mesure de COV doit être accompagnée d'une description de la méthode utilisée afin que les résultats puissent être interprétés correctement (24).

III.3. Origine des COV au laboratoire d'AMP

Les COV mis en évidence au laboratoire d'AMP proviennent de l'extérieur et de l'intérieur du bâtiment où est situé le laboratoire, mais aussi de l'intérieur même des pièces constituant le laboratoire (86,87,113,116).

Dans leur publication, Cohen *et al*. mettent en évidence une accumulation de COV issus des espaces adjacents au laboratoire d'AMP. Parmi les COV retrouvés par les auteurs, l'enflurane, un gaz anesthésiant, était utilisé dans les blocs opératoires adjacents au laboratoire d'AMP. La présence de gaz réfrigérants détectés serait liée au système de ventilation des bâtiments. Enfin, des taux notables d'hydrocarbones aliphatiques de haut poids moléculaire s'expliqueraient par des phénomènes de combustion ou d'émission de particules diesel (circulation dense de véhicules dans les zones urbaines) (86). Des COV sont, par ailleurs, issus de produits utilisés au laboratoire comme les boites de Pétri ou bonbonnes de CO_2 (cf figure 14) (86,117). Les matières plastiques (notamment le polystyrène) que comportent les boites de Pétri libèrent des vapeurs de styrène, un composé carcinogène (86,113). Cette toxicité des matières plastiques pour n'importe quel type de cellule cultivé à leur contact a depuis longtemps été observée (118). Les incubateurs sont constitués à 95% d'air provenant de la pièce du laboratoire et à 5% d'air provenant de bonbonnes de gaz (CO_2) raccordées (86,112). Le taux maximal en COV de l'air des bonbonnes répond à des critères valables pour une exposition professionnelle humaine répétée. Ce taux ne peut être considéré comme un taux compatible avec la culture exigeante des embryons humains (86).

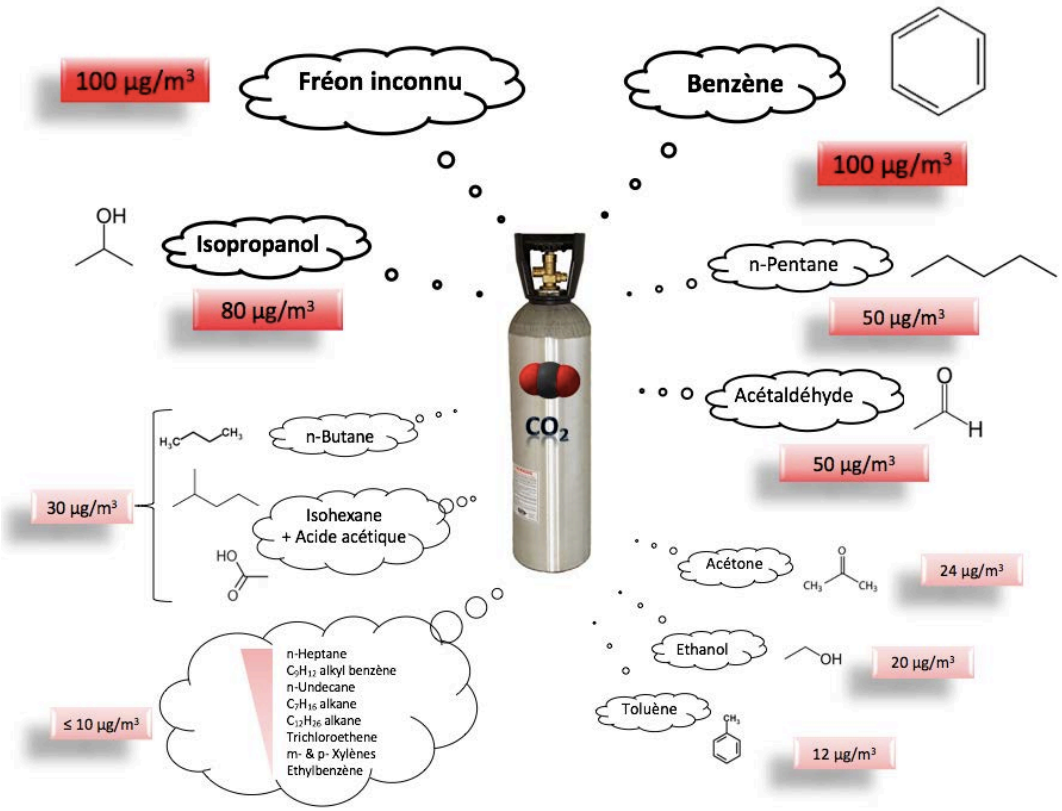


Figure 14 : COV détectés dans une bonbonne de CO2 utilisée pour les incubateurs des laboratoires d'AMP (d'après (86))

Cohen *et al*. notent également que l'utilisation de certains produits détergents pour le bionettoyage des sols des hôpitaux peut s'accompagner d'une détection de *d*-limonène (fréquemment utilisé comme parfum dans la composition de ces produits) au niveau des étuves du laboratoire d'AMP (86).

Le formaldéhyde ne se retrouve quasiment jamais en concentration importante en extérieur car ce COV est rapidement dégradé par le rayonnement solaire ou des bactéries présentes dans l'eau ou le sol. En revanche, il peut tout à fait s'accumuler en environnement intérieur comme au laboratoire d'AMP où sa principale origine correspond aux matières plastiques, consommables ou fournitures de laboratoire (87).

Des COV retrouvés au laboratoire de FIV peuvent aussi être issus de changements environnementaux intervenus dans la périphérie du bâtiment du laboratoire comme des ravalements de route ou des constructions de nouveaux bâtiments (113).

Une analyse des COV détectés accompagnée en parallèle d'un examen rigoureux des FDS des différents produits présents dans l'environnement limitrophe du laboratoire d'AMP ou en son sein, permet une corrélation explicative (86).

III.4. Impact des COV sur les gamètes et les embryons humains

III.4.1. Mécanisme d'action

Les COV seraient des composés embryo-toxiques directs ou indirects après réaction avec d'autres molécules atmosphériques formant alors un composé toxique, comme expliqué précédemment. Ces composés induiraient notamment une déplétion intracellulaire en agents anti-oxydants comme le glutathion, exposant ainsi les gamètes et embryons à l'action de radicaux libres de l'oxygène ou autres agents oxydatifs (113,119). En effet, le glutathion sous sa forme réduite est un substrat essentiel lors des réactions de conjugaison détoxifiantes, catalysées par l'enzyme glutathion-S-transferase (113). De manière générale, les embryons sont particulièrement sensibles à l'action de toxiques comme les COV pendant la phase dite pré-implantatoire (120).

Cet impact pourrait avoir un effet négatif sur les taux de fécondation en FIV (87). L'étude de Hall *et al*. met en évidence une diminution du développement embryonnaire corrélée à la présence d'acroléine (113). Avant cette étude, ce COV était déjà connu pour ses effets toxiques sur les embryons de souris (121). Par ailleurs, Maluf *et al*. ont montré que les embryons de souris sont sensibles à l'action de particules fines de l'air : ces polluants seraient à l'origine d'une anomalie de ségrégation de la masse cellulaire interne et des lignées cellulaires donnant le trophectoderme au stade blastocyste (122). L'étude de Perin *et al*. met en évidence une association entre une exposition aigue à des taux importants de PM_{10} pendant la phase folliculaire (période préconceptionnelle) et la survenue de fausses couches, chez des femmes suivies en AMP et chez des femmes n'ayant pas eu recours à l'AMP pour concevoir. Cette conclusion suggère un effet seuil des COV et particules polluantes de l'air plutôt que « dose-indépendant » sur la reproduction humaine (123).

Concernant l'impact spermatique, certaines études démontrent un effet néfaste des COV sur la qualité des spermatozoïdes (124,125). Rubes *et al*. expliquent que certains COV comme les HAP peuvent atteindre les testicules et former par la suite des adduits sur l'ADN spermatique (124). Leur théorie s'appuie notamment sur des études antérieures ayant prouvé l'existence d'adduits d'HAP sur l'ADN dans le sang ainsi que dans le placenta (126,127). Le résultat de leurs travaux montre une fragmentation de l'ADN spermatique augmentée (évaluée par Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)) en corrélation avec des épisodes de pollution de l'air (124).

III.4.2. Données de la littérature

Peu d'études existent dans la littérature à propos d'un impact de la qualité de l'air au laboratoire d'AMP et des COV sur la viabilité des gamètes et le développement embryonnaire (86,119,128). Certains travaux montrent qu'une amélioration du taux de fécondation en FIV est corrélée avec une amélioration de la qualité de l'air par le biais de l'application de systèmes de filtration (24,87,116,119,129–139). En revanche, d'autres études ne retrouvent pas cette amélioration (86,112,113,140–142).

Le tableau présenté en annexe I résume l'ensemble des publications (avec observations statistiquement significatives) dont certains résultats sont discutés dans cette partie.

III.4.2.a. Études montrant un intérêt à améliorer la qualité de l'air au laboratoire d'AMP

L'étude rétrospective de Munch *et al*. montre l'intérêt d'une filtration chimique de l'air avec charbon activé. Pendant la période d'absence de filtration, les taux de fécondation, de clivage et de blastulation sont faibles. Ces constatations ont été particulièrement mises en évidence pour les embryons issus des cycles d'ICSI. Selon les auteurs, ce phénomène peut s'expliquer par une éventuelle protection du zygote par les cellules du cumulus lors de la procédure de FIV classique. Il est à noter que ces résultats ne sont, en revanche, pas du tout observés pour les embryons obtenus et cryoconservés avant l'arrêt du système de filtration, puis décongelés et cultivés pendant la période d'absence de filtration. Ceci suggère que les embryons humains sont préférentiellement impactés pendant la période péri-fécondation *in vitro*. Finalement, les auteurs suspectent qu'une augmentation de la concentration en COV dans leur laboratoire due à l'arrêt du système de filtration explique les phénomènes observés et notamment l'altération du développement embryonnaire. Ils recommandent donc l'utilisation d'un système de filtration des composés contenant du carbone de l'air dans un laboratoire d'AMP. Toutefois, le caractère rétrospectif de cette étude est une limite évidente. Par ailleurs, les auteurs notent que les taux d'implantation et les taux de grossesse par transfert ont été inchangés durant toutes ces périodes. Cependant, en réponse à des embryons de moins bonne qualité, la mesure corrective appliquée dans leur centre a été de transférer davantage d'embryons, ceci entrainant un biais dans l'interprétation du taux stable de grossesse. Enfin, aucune mesure chimique précise n'a été réalisée pour prouver une augmentation significative du taux de COV dans le laboratoire (119).

Boone *et al*. ont construit une pièce « salle propre » de classe 100 pour leurs activités d'AMP de façon à limiter le plus drastiquement possible la présence de COV au laboratoire. Une « salle propre » de classe 100 correspond à un laboratoire ISO classe 5 (maximum de 3530 particules de dimension supérieure ou égale à 0,5 $\mu m/m^3$). Dans leur étude rétrospective, ils démontrent qu'il existe un lien entre l'amélioration de leur taux de fécondation et taux de grossesse, et la construction d'une telle pièce avec les procédés de filtration de l'air mis en place. Un air de meilleure qualité permettrait ainsi d'obtenir une meilleure qualité gamétique. Un biais majeur réside toutefois dans le fait qu'ils ont en parallèle changé de technique de transfert embryonnaire. De plus, aucune mesure de COV n'a été effectuée (116).

De la même manière, Jindal *et al*. ont construit un nouveau laboratoire avec filtration HEPA et filtration des COV avec permanganate de potassium. Leurs résultats s'en trouvent nettement améliorés et notamment les taux de grossesse (46,8% versus 32,9%, p=0,005). Après ajustement en fonction des paramètres liés aux patients (âge, FSH, nombre d'embryons transférés etc.), une association entre nouvel environnement du laboratoire et taux de grossesse plus élevée a été mis en évidence (OR 1.94, IC 95% : 1.2-3.2, p<0.01) (137).

Khoudja *et al*. ont constaté une réduction des taux en COV après installation d'un nouveau système de filtration de l'air (type Landson^{TM} système) et une amélioration parallèle des taux de fécondation et d'implantation. Certains COV comme le propylène ou le propane n'ont toutefois pas diminué significativement en taux (87).

De nombreuses études comme celle de Mayer *et al*. ont montré une amélioration des taux de grossesse après l'application d'un système Carbon-Activated Air Filtration (CODA®) sans pour autant améliorer la qualité embryonnaire. Merton *et al*. l'ont démontré pour des embryons bovins (143). Les auteurs font l'hypothèse qu'une amélioration de la qualité intrinsèque de l'embryon, non évaluable avec les critères morphologiques habituellement utilisés par les embryologistes, est observée avec ce type de système filtrant (143). Ce système autonome CODA® apparaît comme performant selon Forman *et al*. : associé à un système HEPA et avec charbon actif ainsi qu'un filtre utilisant du permanganate de potassium, il a permis une diminution des taux en COV, particules et aldéhydes (130). D'autres études ou utilisations en routine n'ont en revanche montré aucune amélioration du développement embryonnaire et des taux d'implantation si des étuves étaient équipées du système CODA® (87,140).

Dans une étude rétrospective sur 7 ans (entre 2000 et 2007) et 7403 cycles d'AMP, Legro *et al*. ont montré une association entre certains polluants de l'air extérieur, notamment le dioxyde d'azote, et faibles taux de grossesse après FIV. Cette association confirme l'intérêt d'un air filtré et contrôlé au laboratoire d'AMP afin de maximiser les chances de grossesse chez des couples infertiles (132).

Worrilow *et al*. ont procédé à une analyse rétrospective afin d'établir un lien entre les taux de particules et de COV dans un laboratoire classe 100 (ISO classe 5) d'une part et les paramètres spécifiques de l'embryogenèse et taux d'implantation d'autre part. Ils concluent que les taux d'implantation sont liés aux taux de COV : une augmentation du taux de toluène pendant une période s'est accompagnée d'une diminution du taux d'implantation en parallèle (134).

Heitmann *et al*. ont constaté une corrélation entre amélioration de la qualité de l'air de leur laboratoire par le biais d'équipements CODA®, et amélioration du taux d'implantation (avec un meilleur taux de blastulation et une meilleure qualité des blastocystes) ainsi que du taux de naissances vivantes. Aucune mesure de COV n'a toutefois été réalisée pour prouver l'amélioration de la qualité de l'air. En revanche, aucun autre changement n'étant intervenu dans leur laboratoire pendant la période étudiée (pas de changement de personnel, équipements ou procédures), les auteurs concluent à un véritable intérêt de l'application d'un système de filtration de l'air (136). Leur conclusion est en adéquation avec l'idée d'une criticité de la filtration de l'air selon les laboratoires d'AMP les plus performants des Etats-Unis, mise en évidence par l'enquête de Van Voorhis *et al*. (144). Selon cette enquête, 7 des 10 centres de FIV aux USA utilisent un système de filtration de l'air HEPA associé à une filtration chimique en phase solide pour les COV (144).

III.4.2.b. Études mettant en cause l'intérêt d'un air filtré au laboratoire d'AMP

Cohen *et al*. ont mis en évidence que l'air extérieur non filtré serait plus sain que l'air filtré par système High Efficiency Particulate Air (HEPA) ou l'air contrôlé présent au niveau des incubateurs. L'accumulation de COV issus des espaces adjacents au laboratoire d'AMP (comme évoqué dans la partie précédente) expliquerait ce constat (86).

Hall *et al*. ont réalisé des prélèvements d'air dans sept laboratoires de FIV, tous équipés du système HEPA, de systèmes de ventilation spécifiques au laboratoire et utilisant des incubateurs standards (5% CO_2). L'étude montre que le taux de COV est croissant de l'extérieur du bâtiment (taux moyen en COV totaux de 533 $\mu g/m^3$), à l'intérieur du laboratoire (taux moyen en COV totaux de 2862 $\mu g/m^3$) jusqu'à l'intérieur des étuves (taux moyen en COV totaux de 2769 $\mu g/m^3$) (113).

Souza *et al*. ont réalisé une étude comparative rétrospective entre 2 environnements d'incubation ISO classe 8 versus ISO classe 5. Les auteurs ont ainsi voulu observer l'influence de l'environnement gazeux des incubateurs sur le développement embryonnaire. La norme ISO 14644-1 définit qu'un air ambient ISO classe 5 présente un maximum de 3530 particules de dimension supérieure ou égale à 0,5 $\mu m/m^3$ tandis qu'un air ambient ISO classe 8 compte un maximum de 3530000 particules de cette même dimension. Cette différence entre les environnements gazeux des étuves a pu être obtenue par filtration HEPA de l'un des deux incubateurs utilisés, recréant alors un air ambient ISO classe 5. Cependant, aucune différence significative dans les taux de fécondation et taux de clivage précoce n'a été observée entre les 2 groupes d'embryons dans les 2 types d'étuves (112).

Battaglia *et al*. ne montrent aucune amélioration des indicateurs en FIV avec le système CODA® (140). L'étude de McLellan *et al*. ne met également en évidence aucun avantage à l'utilisation d'un système de filtration type CODA® pour les incubateurs (141). Enfin, Sene *et al*. ont comparé l'utilisation d'une filtration HEPA seule versus HEPA et filtres pour COV dans les incubateurs. Aucune différence de résultat en FIV n'a été observée entre les 2 groupes (142).

Contrairement à l'enquête américaine de Van Voorhis *et al*. qui relate que la plupart des laboratoires de FIV sont équipés d'un système de traitement de l'air (144), une étude européenne visant à effectuer un sondage des centres d'AMP en Europe montre que seule 1 clinique sur 10 est équipée d'un système spécifique pour filtrer et éliminer les COV (145). Cette différence entre Europe et Etats-Unis peut toutefois s'expliquer par le fait que l'étude américaine a été réalisée 6 ans après le sondage européen, et les pratiques entre les 2 continents ne sont pas les mêmes (128).

III.4.2.c. Conclusions et points à prendre en compte

Malgré ces quelques études, il est très difficile de vérifier l'impact réel des conditions d'air au laboratoire d'AMP car de nombreux facteurs concomitants peuvent entrainer des biais (86). Ces facteurs peuvent notamment être inhérents à un laboratoire particulier, localisé dans

un environnement atmosphérique et limitrophe spécifique (143). Par ailleurs, la plupart des études présentées sont des études rétrospectives avec parfois des changements de techniques ou de populations de patients entre différentes périodes comparées, ce qui constitue un biais important (128). De plus, le manque d'association forte entre particules de l'air et indicateurs en FIV peut s'expliquer par la durée relativement courte des cultures en FIV, un système de culture sous huile minérale et la présence d'antibiotiques dans les milieux de culture (128). La réalisation d'études prospectives permettrait de vérifier s'il existe un réel impact de la qualité de l'air sur le développement embryonnaire (24,116). Toutefois, pour des raisons évidentes d'éthique médicale, ce genre d'expérimentation sera très difficile à mener (119). Il conviendrait également de vérifier l'intérêt des unités de filtration comme les systèmes HEPA dans chaque laboratoire d'AMP en fonction de leur environnement limitrophe (112). Esteves et Bento rappellent que l'intérêt de l'application d'un système de filtration ou l'utilisation d'une « salle propre », pour correspondre aux exigences des directives européennes en matière de qualité de l'air (9), fait toujours débat à l'heure actuelle (notamment en raison du coût et de la faisabilité d'un tel système) (24). Certains auteurs pensent même que ces systèmes ne permettent pas de diminuer le risque de contamination microbienne (lié aux micro-organismes portées par les particules de l'air) mais pourraient par ailleurs compromettre l'obtention de conditions favorables à la culture embryonnaire ou gamétique, par la génération d'un flux d'air refroidissant perturbant le maintien d'un pH et d'une température optimale pour les gamètes et embryons humains (146–148). À l'inverse, d'autres auteurs sont favorables à l'application de ces directives (24,149).

Enfin, des paramètres physiques peuvent entraîner des biais majeurs dans l'évaluation de la capacité d'un filtre à capter des COV. En effet, la température extérieure et le taux d'humidité influencent grandement l'efficacité des systèmes de filtration car plus ces paramètres sont élevés, plus la désorption des COV adsorbés est précoce (150,151).

III.5. Méthodes pour limiter le taux en COV

Khoudja *et al*. évoquent un taux optimal de COV inférieur à 0,2 ppm pour éviter tout impact embryonnaire, même si le niveau zéro serait évidemment préférable (87). Worrilow *et al*. mettent en évidence que 2,2 à 2,7 ppb de toluène suffirait à affecter le taux d'implantation (150).

Au laboratoire d'AMP, différents facteurs permettent de limiter le taux et les effets néfastes des COV :

- Le flux d'air naturel du laboratoire (86,113) ;
- La réglementation en matière de seuil toléré en COV (23,86) ;
- La taille, la localisation géographique hors d'une zone très urbaine et les plans du bâtiment dans lequel se trouve le laboratoire d'AMP (10,86,113) ;
- L'utilisation d'un système de sur-pression, d'un SAS contrôlé, de filtres « Ultra Low Penetration Air » (ULPA) au niveau des conduits d'arrivée d'air pour la ventilation (86,87,113,116) ;

- Les équipements du laboratoire comme des unités d'ionisation, des systèmes HEPA, des systèmes filtrants avec charbon activé ou permanganate de potassium, des systèmes autonomes type CODA® (86,87,113,116) ;
- Les méthodes dérivés de l'oxydation ultra-violet photocatalytique « UltraViolet PhotoCatalytic Oxidation » (UVPCO) (152) ;
- Les milieux de culture embryonnaire et le recouvrement par de l'huile minérale des boites de culture (86) ;
- L'utilisation d'un système de co-culture avec des cellules épithéliales utérines bovines (lorsque les premières tentatives de FIV montrent un développement embryonnaire anormal) (86) ;
- L'interdiction de l'usage de parfums, cosmétiques et autres produits de beauté par le personnel de laboratoire (24) ;
- L'évaluation périodique des COV présents par des mesures quantitatives dans le cadre d'un véritable contrôle qualité (notamment par CPG-SM) (24).

III.5.1. Systèmes de filtration

L'élimination des particules de l'air nécessite un passage forcé de l'air via une pression positive à travers une série de filtres d'efficacité croissante. L'efficacité du filtre est obtenue en diminuant le diamètre des pores des membranes. Tout d'abord, la filtration simple de l'air élimine les particules de tailles importantes telles que la poussière, et par la suite, des filtres à particules de haute efficacité (HEPA) ou des filtres à air ultra basse pénétration (ULPA) piègent de petites particules, des moisissures, des spores et des bactéries, diminuant ainsi la contamination microbiologique (24).

Un système de filtration des composés contenant du carbone avec charbon activé (notamment dérivé de la noix de coco) adsorbe très bien les COV et représente un intérêt plus grand que le système de filtration HEPA (86,119,151). Ce dernier permet d'évacuer environ 99,9% des particules de 0,3 µm, sans pour autant éliminer les COV, 100 à 1000 fois plus petits que la taille des pores des filtres HEPA (24,86,119). Les autres filtres utilisés pour la purification des milieux de culture et parfois placés à l'intérieur des conduits de gaz (acheminement du CO_2) ont des pores beaucoup plus grands que la taille des molécules organiques ou inorganiques de faible poids moléculaire (86). Le système CODA® a été introduit en 1997 et correspond à un système de filtration placé à l'intérieur des incubateurs, associé à un filtre rajouté sur l'arrivée de gaz des étuves et une « tour CODA® » filtrant l'air de la pièce de laboratoire (87).

III.5.2. Méthode UVPCO

L'oxydation UV photocatalytique utilise l'énergie des rayons UV absorbés par un oxyde métallique semi-conducteur (par exemple, l'oxyde de titane) pour produire des espèces réactives à la surface du photocatalyseur qui réagissent alors avec des COV adsorbés. La photo-oxydation des COV conduit à une minéralisation partielle (c'est-à-dire à la conversion en CO_2, en eau et en d'autres espèces inorganiques) et produit également des sous-produits partiellement oxydés (152). Les sous-produits non volatiles restent adsorbés sur la surface du photocatalyseur mais

les sous-produits volatiles peuvent être relargués et constituer des polluants secondaires, ce qui constitue le principal inconvénient de cette technique (153,154).

III.5.3. Système de co-culture

Le mécanisme détoxifiant d'un système de co-culture n'est pas précisément connu mais il permettrait de diminuer l'influence péjorative d'une mauvaise qualité de l'air, en particulier sur les embryons avec un faible pronostic de développement. Wiermer *et al*. envisagent que ces cellules somatiques cultivées simultanément diminueraient le taux en radicaux libres de l'oxygène (155).

III.5.4. Choix des produits utilisés au laboratoire et protocoles de bionettoyage

Un examen détaillé ou une réévaluation des Fiches De Sécurité (FDS) et notamment de la composition chimique des produits entrant au laboratoire ou utilisés autour du laboratoire doit être réalisé afin de limiter l'utilisation de produits potentiellement dangereux. Par ailleurs, les protocoles de bionettoyage doivent être validés pour limiter tout dégagement de VOC. Un nettoyage approfondi avec des détergents à base d'alcool doit être interdit. Ceci est d'autant plus important que les colonisations microbiennes spontanées sont rares dans les espaces filtrés HEPA. La seule origine possible reste les prélèvements gamétiques tel que le plasma séminal ou encore le liquide folliculaire mais ceci est évitable par un respect rigoureux des règles d'asepsie au laboratoire, par la vérification de la spermoculture et des prélèvements vaginaux voie basse avant toute tentative de FIV et par une antibioprophylaxie chez certains patients. Enfin, la maintenance des systèmes de chauffage et de climatisation doit être régulière (86).

PARTIE II : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

Dans la pratique courante des laboratoires d'AMP, un certain nombre de produits décontaminants est utilisé pour nettoyer le matériel en contact avec les prélèvements biologiques au cours de leur traitement et de leurs incubations/conservations sur plusieurs jours. Or, il est fort probable que ces produits décontaminants persistent à l'état de traces sur le matériel, même après rinçage, et interagissent de manière indirecte avec les gamètes et les embryons en développement, notamment par l'émission potentielle de COV comme expliqué dans les parties précédentes. À ce jour, la littérature ne rapporte aucune étude visant à évaluer et comparer la repro-toxicité de ces produits biodécontaminants utilisés en laboratoire d'AMP.

Ainsi, l'étude BIONETTOX-FIV avait pour objectif d'étudier la repro-toxicité de deux produits de bionettoyage à l'aide d'un mode opératoire original basé sur le test SpST. Le choix d'un tel test de repro-toxicité a été fait en raison de la grande sensibilité du test selon la littérature, d'une rapidité de réalisation nous permettant d'envisager plusieurs incubations, et enfin d'une accessibilité correcte des prélèvements spermatiques dans le cadre du travail de routine de notre service de Biologie de la Reproduction. Nous présentons dans une première partie l'étude préliminaire qui a permis de valider le mode opératoire utilisé, puis dans une seconde partie l'étude BIONETTOX-FIV sera abordée.

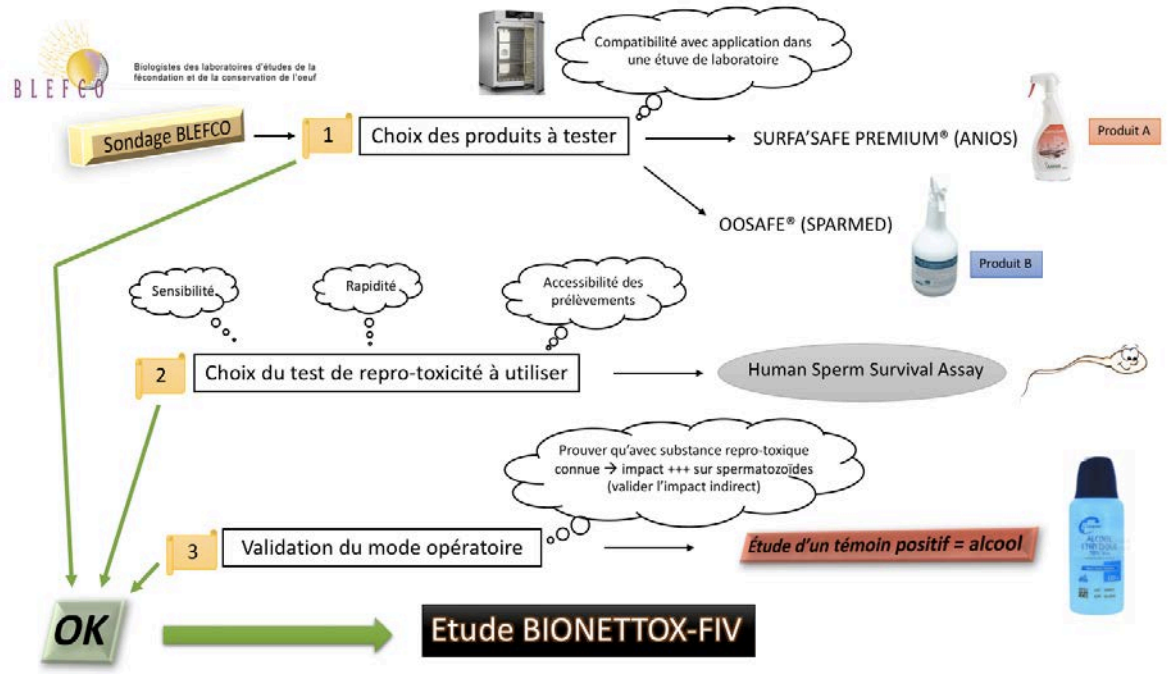


Figure 15 : Chronologie et étapes préliminaires de l'étude BIONETTOX-FIV

I Validation du mode opératoire : étude préalable témoin positif

Des tests préliminaires ont été réalisés à l'hôpital Antoine Béclère (Clamart) dans le service de Biologie de la Reproduction, dirigé par le Pr Nelly Frydman, pour valider le mode opératoire proposé. Le but de ces expériences préliminaires était de démontrer que le mode opératoire utilisé permettait bien de mettre en évidence l'impact fort indirect d'une substance définie et connue comme repro-toxique : l'alcool (éthanol 70%).

I.1. Choix des prélèvements spermatiques et qualification

Pour chaque incubation de 24h à 37°C, à J0, deux spermes (un seul pour la première incubation) aux caractéristiques normales selon l'OMS (normospermes) provenant de l'activité de routine du laboratoire de biologie de la reproduction ont été conservés. Ces prélèvements présentaient les caractéristiques suivantes :

Tableau 4 : Valeurs normales du spermogramme (source : site OMS http://www.who.int/fr/)

Paramètres spermatiques	Valeurs seuils
Volume éjaculé	1,5–6 mL
Numération par mL	> 15 millions
Numération par éjaculat	> 39 millions
Mobilité totale (progressive + non progressive)	> 40 %
Vitalité	> 58 %
Pourcentage de formes normales	> 30 %
Leucocytes	< 1 million

Dans le cadre de leur utilisation thérapeutique en AMP, les prélèvements spermatiques étaient qualifiés (mobilité et vitalité) puis préparés par méthode de gradient de densité Pursperm® 90%/45% (centrifugation à 1500 tr/min pendant 20 min après dépôt du sperme frais sur le gradient) suivi d'un lavage (avec du Ferticult et centrifugation à 1700 tr/min pendant 10 min). Une numération en cellule de Malassez était réalisée sur la préparation spermatique finale. Après mise en œuvre de l'acte d'AMP (FIV ou ICSI), le surplus de préparation spermatique finale était recueilli et avant de lancer l'expérimentation, une qualification des paramètres spermatiques était à nouveau effectuée : mobilité et vitalité spermatique.

La mobilité spermatique a été réalisée selon la méthodologie détaillée dans la partie « Matériels et méthodes » ci-après. La vitalité spermatique a été évaluée selon le protocole en vigueur dans le service de biologie de la reproduction de l'hôpital Antoine Béclère :

- Dans un petit tube en plastique mettre 10µl d'éosine + 10µl sperme puis vortexer ;
- Ajouter 20 µl de nigrosine et vortexer à nouveau ;
- Déposer une goutte du mélange sur une lame en verre, étaler le frottis, laisser sécher puis observer au microscope à l'objectif X40 ;
- Les spermatozoïdes vivants (ne laissant pas passer le colorant) apparaissent blancs alors que les spermatozoïdes morts prennent une coloration rose ;
- Compter 100 spermatozoïdes pour obtenir le % de vitalité.

I.2. Mise en place de l'incubation

Par la suite, la répartition suivante a été appliquée pour les deux boites NUNC® 4 puits dans lesquelles les prélèvements étaient placés : (NB : FH = Ferticult Hepes®)

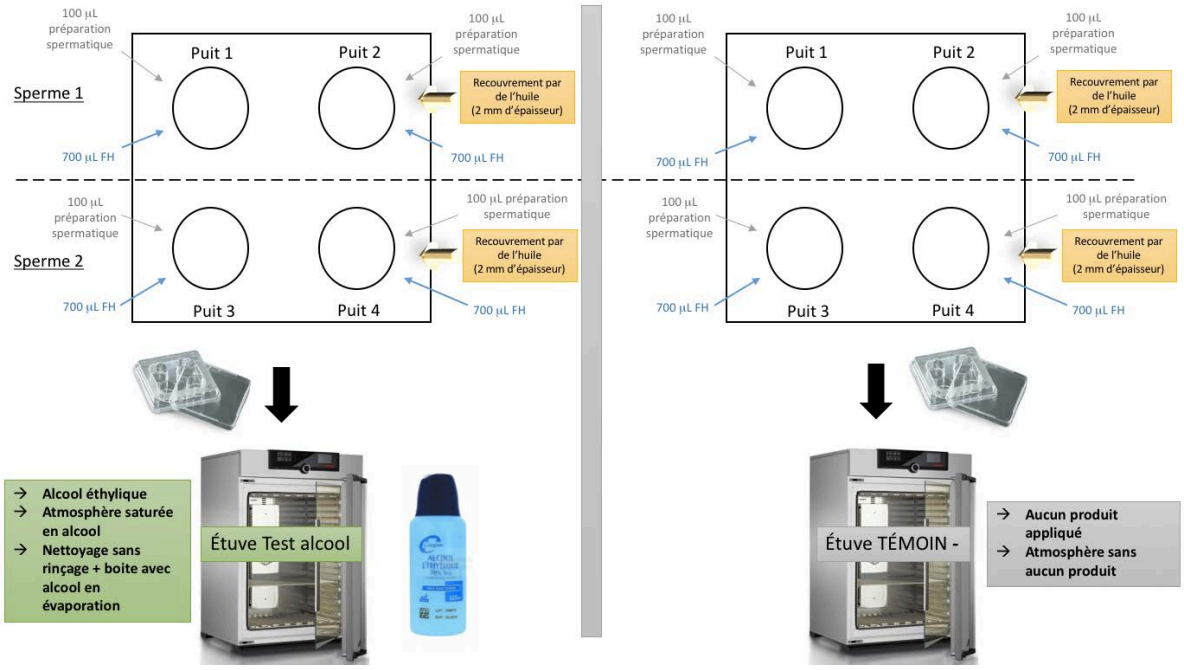
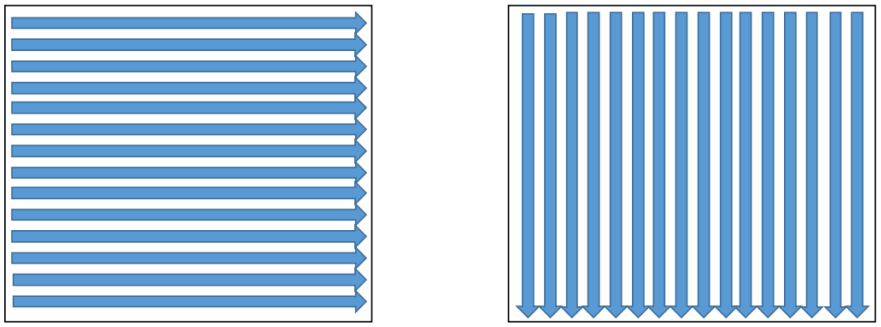


Figure 16 : Répartition des spermes et milieux de culture dans les boites NUNC - étude préliminaire témoin positif

Chaque puit comportait plus d'1 million de spermatozoïdes. Pour chaque sperme, un des 2 puits lui étant attribué dans chaque boite NUNC® a été recouvert d'huile minérale. Ces puits ont permis de mieux mimer les conditions de culture embryonnaire.

Avant de placer les boites NUNC® une fois préparées dans chaque étuve pour 24h d'incubation, le protocole suivant a été appliqué :

- Nettoyage de l'étuve test alcool avec une compresse imbibée d'alcool selon le schéma ci-après pour toutes les surfaces planes de l'intérieur de l'enceinte de l'étuve ;



- Remplissage d'une boite de Pétri avec de l'alcool, placée dans l'étuve en évaporation pendant les 24h d'incubation à 37°C : une atmosphère saturée en alcool a ainsi été obtenue.

L'heure d'incubation était notée de manière à respecter rigoureusement 24h d'incubation. À J1 (après 24h d'incubation) la mobilité et la vitalité spermatique ont été évaluées pour chaque puit.

I.3. Résultats

Pour le calcul des SpST index, la formule a été la suivante :

$$SpST\ index = \frac{\%\ mobiles\ progressifs\ après\ incubation\ dans\ l'étuve\ test\ alcool}{\%\ mobiles\ progressifs\ après\ incubation\ dans\ l'étuve\ témoin\ négatif}$$

Cette formule a été calculée d'une part pour les puits sans huile, et d'autre part pour les puits avec huile.

Tableau 5 : Synthèse des résultats de l'étude préliminaire témoin positif

			Après incubation						
			ETUVE ALCOOL		ETUVE TEMOIN NEGATIF				
Expérience (n°)	Concentration sperme utilisé (en M/mL)	Mobilité progressive avant incubation (a + b) (en %)	Puit sans huile (a + b) (en %)	Puit avec huile (a + b) (en %)	Puit sans huile (a + b) (en %)	Puit avec huile (a + b) (en %)	SpST index (puit sans huile)	SpST index (puit avec huile)	Conclusion
1	19,6	80	0	56	67	73	0	0,767123288	Reprotoxique
2	36	65	0	49	35	68	0	0,720588235	Reprotoxique
3	34,8	80	0	60	74	88	0	0,681818182	Reprotoxique

(NB : les résultats de vitalité ne sont pas montrés ici)

I.4. Discussion

Pour les normospermes utilisés, la survie est très correcte dans l'étuve témoin négatif. Les résultats de cette étuve permettent de procéder à un calcul de SpST index. Au moyen de cet index, cette étude préliminaire a permis de valider le mode opératoire employé. En effet l'alcool, substance repro-toxique par définition, a induit un SpST index inférieur à 0,85 (Seuil de Nijs *et al.* explicité dans la première partie bibliographique (18)), y compris pour les puits avec huile. À raison de 2 mm d'épaisseur, la couche d'huile minérale semble assurer une bonne protection des spermatozoïdes mais un impact est malgré tout observé. L'alcool est ainsi un bon témoin positif (impact majeur dans les puits sans huile avec une vitalité de 0% à chaque fois).

Le mode opératoire proposé permet donc de mettre en évidence le caractère repro-toxique indirect d'une substance et pourra être utilisé pour évaluer de la même manière des produits bionettoyants de laboratoire.

II Étude BIONETTOX-FIV

II.1. Objectifs de l'étude

II.1.1. Objectif principal

L'objectif principal de l'étude BIONETTOX-FIV a été d'évaluer la toxicité sur les spermatozoïdes de deux produits de bionettoyage commercialisés décrits ci-après, en conditions normales d'utilisation, c'est à dire recommandées par le fabricant.

II.1.2. Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires ont été les suivants :

- Comparer la toxicité sur les spermatozoïdes des 2 produits décontaminants évalués, en conditions normales d'utilisation, telles que recommandées par le fournisseur du bio-décontaminant ;
- Évaluer puis comparer la toxicité sur les spermatozoïdes de 2 produits décontaminants commercialisés, en conditions exagérées d'utilisation, c'est-à-dire sans rinçage et en induisant une atmosphère saturée en produit bio-décontaminant dans l'étuve. En pratique dans les laboratoires d'AMP disposant d'un nombre réduit d'incubateurs et d'un temps de personnel technique réduit également, ceci correspond à une pratique observable ;
- Évaluer l'impact sur la vitalité spermatique de 2 produits décontaminants commercialisés, en conditions normales et exagérées d'utilisation. Cet objectif ne sera évalué que si le pourcentage de spermatozoïdes de classe « d » (immobiles) est supérieur ou égal à 42% ;
- Explorer le(s) composant(s) ou métabolite(s) (COV) des produits décontaminants évalués susceptibles d'être incriminés dans la repro-toxicité potentielle des produits.

II.2. Matériels et méthodes

II.2.1. Prélèvements de sperme utilisés et consentements

Des prélèvements de sperme issus de patients venant au laboratoire de Biologie de la Reproduction de la Maternité du CHRU de Nancy ont été utilisés. Ces patients étaient obligatoirement des patients connus normospermes, c'est-à-dire présentant des paramètres spermatiques normaux selon les normes définies par l'OMS (cf tableau ci-avant), et venant le plus souvent au laboratoire dans le cadre d'une spermoculture de contrôle (examen à réaliser impérativement lors de leur parcours en AMP) ou d'une deuxième analyse spermatique (spermogramme ou TMS de contrôle après un premier résultat normal). Un entretien biologique a été réalisé avec le patient dans le but de lui expliquer le présent protocole de recherche et de lui faire signer un consentement éclairé. Le protocole de recherche a obtenu l'accord du comité éthique du CHRU de Nancy et de la Direction de la Recherche clinique et de l'Innovation (DRI) du CHRU de Nancy.

II.2.2. Produits de bionettoyage testés

Un état des lieux des pratiques de bionettoyage dans les centres d'AMP de France a été conduit en tant que travail préliminaire à ce protocole de recherche. Comme expliqué dans la partie bibliographique, un questionnaire a ainsi été envoyé à l'ensemble des membres de l'association BLEFCO. Le principal objectif de ce questionnaire était de lister les produits utilisés dans chaque centre et d'objectiver le cadre de leur utilisation. Les produits bionettoyants majoritairement utilisés en France ont ainsi été mis en évidence.

Les produits retenus pour être testés ont été les produits suivants, compatibles avec le mode opératoire (application à l'intérieur d'étuves de laboratoire), et majoritairement utilisés dans les centres d'AMP :

- Surfa'safe premium® (Marque : ANIOS ; Code produit : 2419000) **(« Produit A »)** ;
- Oosafe® disinfectant for CO_2 incubators and laminar flow hoods (Marque : SPARMED ; Référence : OODIH-1000) **(« Produit B »)**.

II.2.3. Mode opératoire

Les expérimentations ont été réalisées au Département d'Hygiène, des Risques Environnementaux et Associés aux Soins (DHREAS – Directeur : Dr Arnaud Florentin), situé à la Faculté de Médecine de Nancy. Toutes les manipulations et étapes techniques de préparation ou qualification du sperme ont été réalisées en conditions d'asepsie sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM). Chaque produit bionettoyant a été testé en utilisant 20 prélèvements spermatiques (n=20 par produit bionettoyant). Chaque expérimentation a été réalisée avec deux spermes frais obtenus le jour même. Une expérimentation ainsi nommée est définie ultérieurement dans le mode opératoire.

II.2.3.a. Validation des spermes à utiliser

Pour s'assurer globalement de la présence de spermatozoïdes dans le recueil du jour, une goutte a été observée entre lame et lamelle. Si des spermatozoïdes ont été observés, un lavage a ensuite été pratiqué selon le protocole suivant :

- Dans un tube à fond conique Falcon®, placer 1 mL de sperme puis 5 x plus de volume de « Ferticult Hepes® » (Ferticult™ Flushing medium – FertiPro) = FH, soit 5 mL (milieu de culture permettant une meilleure survie des spermatozoïdes pendant les 24h d'incubation) ;
- Visser le tube, homogénéiser par retournements ;
- Centrifuger 10 min à 300 g ;
- Éliminer le surnageant à l'aide d'une pipette ;
- Remettre en suspension le culot de centrifugation dans 1,2 mL de FH ;
- Bien homogénéiser.

Les paramètres suivants ont ensuite été évalués sur la préparation spermatique finale obtenue afin de valider l'utilisation de ce sperme lavé : mobilité, numération et vitalité (si besoin).

II.2.3.a.i. Mobilité spermatique

- Dépôt de 2 x 10 µL de suspension spermatique sur une lame en verre (2 gouttes) puis recouvrir les 2 gouttes d'une lamelle (22x22mm) (N.B. : lames et lamelles ont été pré-chauffées sur platine chauffante)
- A partir de cette lame en attente sur la platine chauffante (environ 1 minute), au grossissement Gx200 ou Gx400 :
    - Faire l'évaluation sur minimum 5 champs
    - Evaluer la mobilité de chaque spermatozoïde selon les critères suivants

Tableau 6 : Critères d'évaluation de la mobilité spermatique

Progressifs	**a**	Rapide et progressif	Trajectoires rectilignes
	b	Lent ou faiblement progressif	Trajectoires rectilignes mais faible vitesse ou faiblement progressif (trajectoires non rectilignes ou sinueuses avec vitesse plus ou moins grande)
Non progressifs	**c**	Mobile et non progressif	Déplacement de moins de deux longueurs de tête en une seconde ou, aucun déplacement avec des oscillations de la tête sur place et/ou de simples mouvements flagellaires
Immobiles	**d**	Immobile	Aucun déplacement, tête et flagelle immobiles.

    - Calculer le pourcentage de spermatozoïdes dans chacune des catégories à l'aide d'un compteur → Lire un total de 100 spermatozoïdes
    - Réaliser une 2^{ième} évaluation dans la seconde goutte selon les mêmes principes
    - Calculer la moyenne des pourcentages dans chaque catégorie de mobilité (a + b ; c et d)
        - Remarque : arrondir au nombre pair le plus proche (ex : 37.5 →38 ; 4.5 → 4). Si le total est différent de 100%, retrancher ou ajouter 1 à la catégorie la plus représentée
    - Calculer la différence des pourcentages de la catégorie la plus représentée (a + b ; c ou d)

Tableau 7 : Différence de pourcentage acceptable selon la moyenne (référence : OMS 2010)

Table A7.2 Acceptable differences between two percentages for a given average, determined from replicate counts of 100 spermatozoa (total 200 counted)

Average (%)	Difference*
0	2
1	3
2	4
3	5
4	6
5–6	7
7–9	8
10–12	9
13–15	10
16-19	11
20–25	12
26–33	13
34–66	14

Average (%)	Difference*
67–74	13
75–80	12
81–84	11
85–87	10
88–90	9
91–93	8
94–95	7
96	6
97	5
98	4
99	3
100	2

*Based on rounded 95% confidence interval.

- Renouveler l'évaluation sur une nouvelle goutte si différence non acceptable

II.2.3.a.ii. Vitalité spermatique

Un test de vitalité n'a été effectué que lorsque le pourcentage de spermatozoïdes de classe « d » (immobiles) était supérieur ou égal à 42%.

- Dépôt de 50 µL de suspension spermatique dans un tube à hémolyse 5 mL non stérile
- Utilisation du coffret VitalScreen® (FertiPro)
- Réaliser le test selon les recommandations du fournisseur
- Dans le tube
  - Déposer 2 gouttes de réactif 1 (1% Eosin Y in saline)
  - Attendre 30 secondes
  - Déposer 3 gouttes de réactif 2 (5% nigrosin in saline)
  - Mélanger (vortex)
- Déposer 1 goutte du mélange sur une lame à l'aide d'une pipette pasteur plastique
- Couvrir d'une lamelle (24x60mm)
- Lire immédiatement au microscope
- Compter 200 spermatozoïdes pour déterminer le pourcentage de spermatozoïdes vivants
  - Les spermatozoïdes vivants, ayant une membrane imperméable, ne laissent pas passer l'éosine et présentent donc une tête blanche
  - Les spermatozoïdes morts, ayant une membrane perméable, laissent passer l'éosine et présentent donc une tête rouge ou légèrement rosé
  - Important : % spermatozoïdes vivants ≥ % spermatozoïdes mobiles

II.2.3.a.iii. Numération spermatique

- Après homogénéisation du sperme, et à l'aide d'une pipette à déplacement positif, déposer 50 µL dans chacun des 2 tubes à hémolyse 5mL non stériles prévus pour effectuer la numération ;
- La dilution à utiliser dépend du nombre de spermatozoïdes observés par champ microscopique :

Tableau 8 : Dilution à effectuer en fonction du nombre de spermatozoïdes observés à l'état frais

spz/champ (Gx400)	spz/champ (Gx200)	Dilution	Diluant (µL)
<15	<60	**1/5**	**200**
15-40	60-160	**1/10**	**450**
41-200	164-800	**1/20**	**950**
>200	>800	**1/50**	**2450**

- Monter la cellule : Humecter les deux bords de la cellule, faire glisser la lamelle dédiée à la cellule de Thoma sur la largeur de la cellule et vérifier la bonne adhésion "cellule - lamelle" ;
- Introduire chaque préparation homogénéisée (environ 10 µL) par capillarité à l'aide d'une pipette dans chacune des chambres de la cellule ;
- Attendre environ 5 minutes (nécessaires à la sédimentation des cellules) ;
- Observer rapidement l'ensemble de la chambre pour vérifier la bonne répartition des spermatozoïdes. Dans le cas contraire, faire une nouvelle préparation en insistant particulièrement sur l'étape d'homogénéisation avant remplissage de la chambre ;
- Règles de comptage : effectuer le compte toujours selon le même mode opératoire ;
    - Effectuer un balayage systématique de la chambre en méandre, de haut en bas et de gauche à droite ou de gauche à droite et de haut en bas ;
    - Compter les spermatozoïdes présents sur un grand carré ;

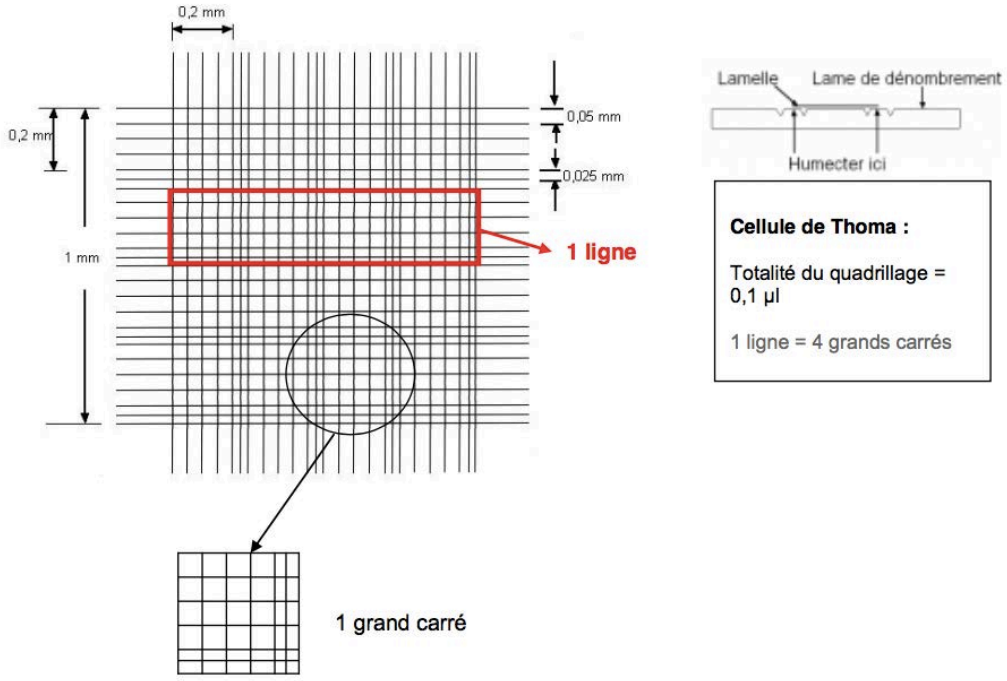


Figure 17 : Description de la cellule de Thoma

- Seuls les spermatozoïdes entiers sont comptés (tête + flagelle) ;
- Si les spermatozoïdes se situent sur une ligne ne compter que les spermatozoïdes présents sur les bordures basse et droite (ou haute et gauche, mais pas les 2) :

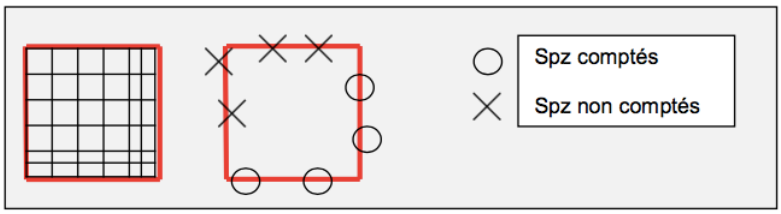


Figure 18 : Règles de comptage lors de l'utilisation de la cellule de Thoma

- Compter les spermatozoïdes au G x200 ou Gx400 ;
- Environ 200 spermatozoïdes dans chacune des deux chambres de la cellule sont comptés

Tableau 9 : Nombre de lignes à compter sur la cellule de Thoma lors de la numération spermatique

Nombre de spermatozoïdes par ligne	Nombre de lignes à compter
<50	**4**
50 à 200	**2**
> 200	**1**

- Répéter le compte dans l'autre chambre ;
- Pour juger de la concordance des comptes dans les deux chambres, faire la somme et la différence des deux comptes ;
- Se reporter au tableau ci-après (OMS) pour voir la différence acceptable entre les deux comptes en fonction de la somme des deux comptes. Si différence trouvée ≥ différence acceptable : refaire la dilution ainsi que les deux comptes selon la procédure décrite ci-dessus ;

Tableau 10 : Différence acceptable entre les deux comptes de spermatozoïdes en fonction de la somme des deux comptes de spermatozoïdes

Table A7.1 Acceptable differences between two replicate counts for a given sum

Sum	Difference*
0-9	3
10-20	9
20-34	10

Sum	Difference*
35–40	12
41–47	13
48–54	14
55–62	15
63–70	16
71–79	17
80–89	18
90–98	19
99–109	20
110–120	21
121–131	22
132–143	23

Sum	Difference*
144–156	24
157–169	25
170–182	26
183–196	27
197–211	28
212–226	29
227–242	30
243–258	31
259–274	32
275–292	33
293–309	34
310–328	35

Sum	Difference*
329–346	36
347–366	37
367–385	38
386–406	39
407–426	40
427–448	41
449–470	42
471–492	43
493–515	44
516–538	45
539–562	46
563–587	47

*Based on rounded 95% confidence interval.

- Calcul de la concentration :
  - Soit $\mathbf{n_{spz}}$ le nombre de spermatozoïdes comptés sur l'ensemble de la grille (la grille a un volume de 0.1 µL soit 10^{-4} mL)
  - Soit $\mathbf{c_{spz}}$ la concentration de spermatozoïdes par mL

$$\mathbf{c_{spz}} = \mathbf{n_{spz}} \text{ x facteur de dilution x } 10^4$$

Si ces 3 paramètres étaient normaux, la préparation spermatique finale était utilisée pour l'expérimentation. Dans le cas où l'un des 2 spermes ne satisfaisait pas aux critères normospermes ou si les 2 prélèvements spermatiques ne satisfaisaient pas à ces critères, l'expérimentation du jour était annulée et reconduite un jour ultérieur avec d'autres recueils de sperme.

II.2.3.b. Expérimentation

Une expérimentation ainsi nommée correspondait au protocole d'incubation suivant.

Une incubation de 24h +/- 2h à une température de 37°C a été réalisée. 5 étuves ont été utilisées simultanément :

- Une étuve **« TEST A Conditions N »**
- Une étuve **« TEST A Conditions E »**
- Une étuve **« TEST B Conditions N »**
- Une étuve **« TEST B Conditions E »**
- Une étuve **« TÉMOIN NÉGATIF »**

Dans chaque étuve, une boite NUNC® 4 puits a été placée. Les puits n°1 et n°2 ont été remplis avec 800 µL d'une préparation de spermatozoïdes en FH (Ferticult Hepes®), provenant d'un premier patient, dite « sperme 1 » (cf figure ci-après). Par ailleurs, les puits n°3 et n°4 ont

été remplis avec 800 µL d'une préparation semblable de spermatozoïdes provenant d'un deuxième patient, dite « sperme 2 ». Les puits n°2 et n°4 ont été recouverts d'huile minérale (Oil for Embryo Culture – Irvine Scientific). Ces puits ont permis de mieux mimer les conditions de culture embryonnaire. La figure suivante résume la répartition effectuée :

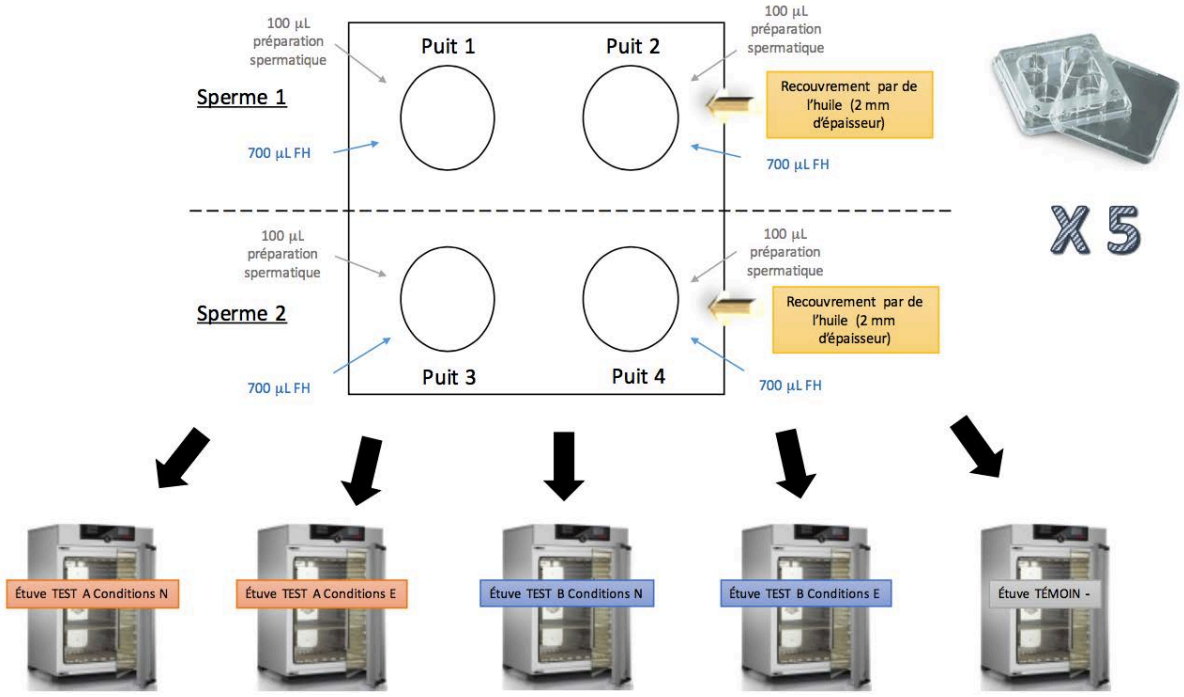


Figure 19 : Répartition des spermes et milieux de culture dans les boites NUNC - étude BIONETTOX-FIV

Dans les étuves « TEST A ou B conditions N », les spermatozoïdes ont été soumis à une atmosphère correspondant aux conditions professionnelles d'utilisation des produits de bionettoyage. Pour cela, l'étuve TEST A Conditions N a été nettoyée à l'aide du produit A puis rincée à l'eau stérile, et l'attente d'un séchage complet a été respectée. Il en a été de même pour l'étuve TEST B Conditions N avec le produit B.

Dans les étuves « TEST A ou B Conditions E », les spermatozoïdes ont été soumis à une atmosphère saturante en produit bionettoyant, mimant une exposition exagérée. Pour cela, l'étuve « TEST A Conditions E » a été nettoyée avec le produit en question (Produit A = Surfa'safe premium®) puis une boite en verre (type boite de Pétri en verre) remplie de produit à tester a été disposée à l'intérieur de l'étuve. Par ailleurs, l'étuve « TEST B Conditions E » a été nettoyée avec le produit en question (Produit B = Oosafe®) puis une boite en verre (type boite de Pétri en verre) remplie de produit à tester a été disposée à l'intérieur de l'étuve.

Dans l'étuve « TÉMOIN NÉGATIF », aucun produit de bionettoyage n'a été utilisé. Un simple rinçage à l'eau stérile a été réalisé puis l'attente d'un séchage complet a été respectée.

II.2.3.c. Analyses spermatiques réalisées après 24h d'incubation

II.2.3.c.i. Description des analyses et calcul des SpST index

Après 24h +/- 2h d'incubation, la **mobilité** et la **vitalité** spermatique (si besoin) ont été déterminées pour tous les puits des boites NUNC® 4 puits des 5 étuves.

Ainsi, **pour chaque boite NUNC®**, les étapes suivantes ont été réalisées :

- Homogénéisation à la pipette pasteur plastique pour les puits sans huile ou au cône avec une pipette à déplacement positif pour les puits recouverts d'huile (moindre mouvement liquidien susceptible de mélanger les 2 phases),
- Pour chaque puit,
    - Détermination de la **mobilité** (cf procédure détaillée ci-avant),
    - Détermination de la **vitalité** : si le pourcentage de spermatozoïdes de classe « d » (immobiles) était supérieur ou égal à 42% (cf procédure détaillée ci-avant),
- Calcul du **SpST index,**

$$SpST\ index = \frac{\%\ de\ spermatozoïdes\ mobiles\ progressifs\ dans\ l'étuve\ TEST\ [A\ ou\ B]\ Conditions\ [E\ ou\ N]}{\%\ de\ spermatozoïdes\ mobiles\ progressifs\ dans\ l'étuve\ Témoin\ négatif}$$

    - Cet index a été calculé d'une part pour le **produit A,**
        - Dans les conditions d'utilisation professionnelle (Rapport résultats étuve TEST A Conditions N et résultats étuve témoin négatif),
            - Pour les puits sans huile → $SpST_{(A\text{-}N)}$
            - Pour les puits avec huile → $SpST_{(A\text{-}N\text{-}H)}$
        - En condition exagérée d'utilisation (atmosphère saturée) (Rapport résultats étuve TEST A Conditions E et résultats étuve témoin négatif)
            - Pour les puits sans huile → $SpST_{(A\text{-}E)}$
            - Pour les puits avec huile → $SpST_{(A\text{-}E\text{-}H)}$
    - Puis d'autre part pour le **produit B,**
        - Dans les conditions d'utilisation professionnelle (Rapport résultats étuve TEST B Conditions N et résultats étuve témoin négatif)
            - Pour les puits sans huile → $SpST_{(B\text{-}N)}$
            - Pour les puits avec huile → $SpST_{(B\text{-}N\text{-}H)}$
        - En condition exagérée d'utilisation (atmosphère saturée) (Rapport résultats étuve TEST B Conditions E et résultats étuve témoin négatif)
            - Pour les puits sans huile → $SpST_{(B\text{-}E)}$
            - Pour les puits avec huile → $SpST_{(B\text{-}E\text{-}H)}$

Comme expliqué en partie bibliographique, le SpST index permet de conclure quant à la repro-toxicité du produit testé :

- Si SpST index < 0,85 : le produit testé est considéré repro-toxique,
- Si SpST index > ou = 0,85 : le produit testé est considéré comme non repro-toxique.

II.2.3.c.ii. Analyse statistique des résultats

Les moyennes des différents SpST index ont été calculées :

- Pour le produit A
  - $SpST_{(A\text{-}N)}$
  - $SpST_{(A\text{-}N\text{-}H)}$
  - $SpST_{(A\text{-}E)}$
  - $SpST_{(A\text{-}E\text{-}H)}$
- Pour le produit B
  - $SpST_{(B\text{-}N)}$
  - $SpST_{(B\text{-}N\text{-}H)}$
  - $SpST_{(B\text{-}E)}$
  - $SpST_{(B\text{-}E\text{-}H)}$

Les tests statistiques suivants ont été appliqués :

- Si SpST index distribué selon une loi Gaussienne : la moyenne de chacun des SpST index ci-dessus a été comparée à la valeur théorique 0,85 en utilisant un test t de Student (unilatéral) pour petits échantillons,
- Si SpST index non distribué selon une loi Gaussienne : la médiane de chacun des SpST index ci-dessus a été comparée à la valeur théorique 0,85 en utilisant un test non paramétrique de Wilcoxon,
- Comparaison des 2 décontaminants entre eux
  - Si SpST index distribué selon une loi Gaussienne : les moyennes des SpST index (produit A vs B) ont été comparées en utilisant un test t de Student (bilatéral) pour petits échantillons,
  - Si SpST index non distribué selon une loi Gaussienne : les médianes des SpST index (produit A vs B) ont été comparées en utilisant un test non paramétrique de Wilcoxon
- Pour juger si les différentes séries de valeurs suivent une loi Gaussienne ou non, un test de normalité de D'Agostino & Pearson a été utilisé,
- Un seuil de signification de 5% a été retenu pour toutes les analyses.

II.2.3.d. Explorations chimiques évaluant un potentiel dégagement de COV

Pour expliciter un potentiel impact indirect des produits de bionettoyage sur les spermatozoïdes, différentes analyses chimiques ont été menées pendant les incubations pour évaluer et caractériser les COV présents dans les différentes étuves.

II.2.3.d.i. Mesure du taux de COV total

Une mesure des COV totaux a été effectuée dans chaque étuve, en début puis en fin de chaque expérimentation (après les 24h d'incubation). L'appareil utilisé était un VOC-mètre ppbRAE 3000 (moniteur portable de détection de COV – détecteur à photoionisation – marque RAE SYSTEMS).



Figure 20 : ppbRAE3000 (RAE SYSTEMS)

L'intérêt de ce détecteur réside dans sa très grande plage de mesures de 1 ppb à 10000 ppm. Par ailleurs, le temps de réponse de l'appareil est très faible (3 secondes) et permet une détection « en temps réel ».

La société TERA environnement a fourni un appareil pendant toute la durée des expérimentations. L'étalonnage de l'appareil avant emploi a été réalisé par le laboratoire de cette société.

II.2.3.d.ii. Mesure du Carbone Organique Total (COT)

Pendant 5 expérimentations, un verre de montre a été placé dans les 2 étuves « TEST A ou B Conditions E » et dans l'étuve témoin négatif. Après les 24h d'incubation, une récupération des composés organiques condensés a été effectuée par écouvillonnage sur chaque verre de montre (écouvillons en polyester certifiés < 50 µg/L (ppb) de COT). Deux écouvillonnages par verre de montre ont été réalisés puis chaque écouvillon a été placé dans un flacon en verre (« vial », certifié < 10 µg/L (ppb) de COT) préalablement étiqueté pour identification. Le protocole suivant a été réalisé lors des expérimentations n°2, 3, 4, 5 et 8 :

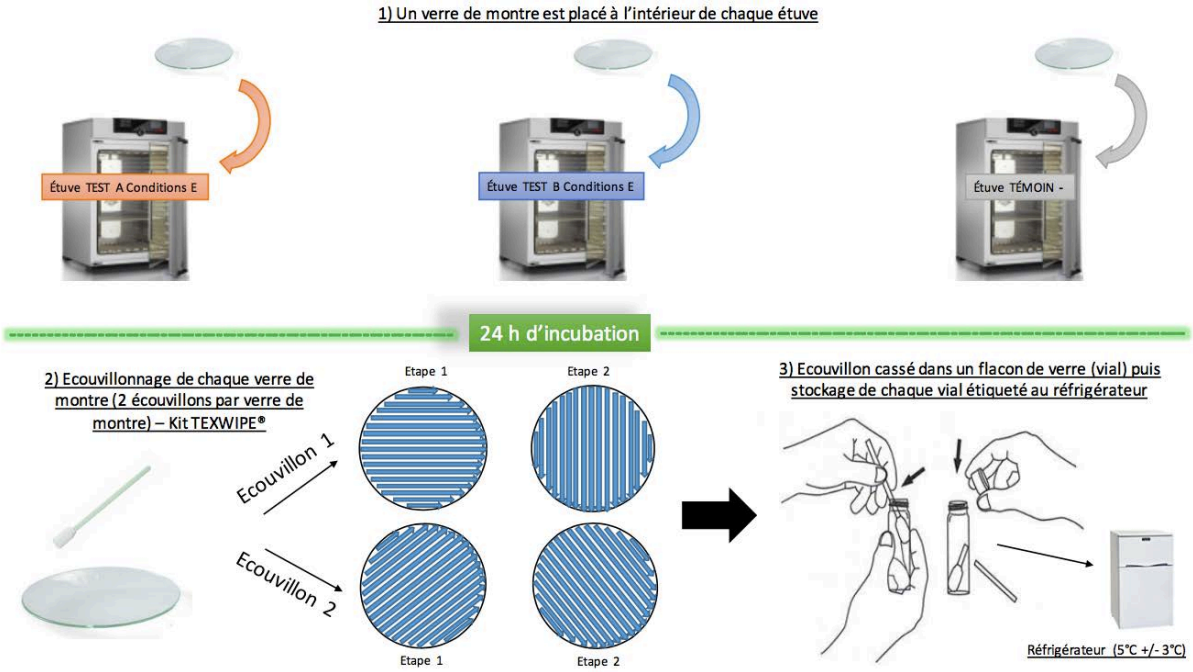


Figure 21 : Mode opératoire pour analyse COT

Le dosage du COT pour chaque écouvillon a été effectué à Sainghin-en-Mélantois au sein du laboratoire analytique ANIOS sur un analyseur TOC-L de Shimadzu.



Figure 22 : Analyseur TOC-L de Shimadzu (source : http ://www.shimadzu.fr)

Pour une même expérimentation et une même étuve, les deux écouvillons ont été rassemblés dans un même vial. Ce vial a ensuite été rempli avec 35 mL d'eau Ultra Pure (UP). Une désorption aux ultrasons a été effectuée avant passage de l'échantillon sur l'analyseur TOC-L de Shimadzu. Le schéma suivant résume les étapes effectuées dans l'appareil.

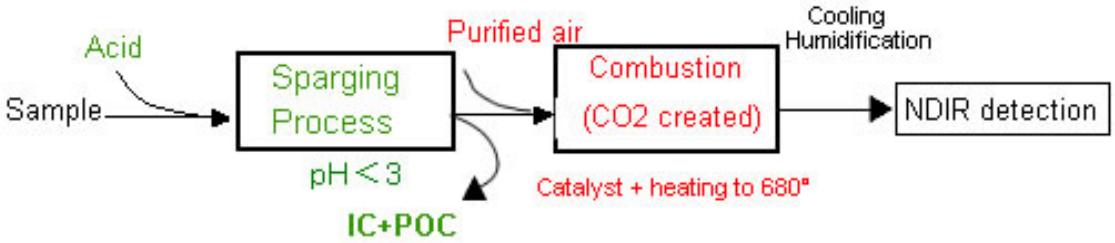


Figure 23 : Schéma du principe de l'analyse NPOC (source : http://www.shimadzu.fr)

La mise en contact de l'échantillon avec un milieu acide (HCl) permet d'éliminer le carbone inorganique (Inorganic Carbon IC) et le carbone organique purgeable (Purgeable Organic Carbon POC). De l'air purifié est ensuite injecté de manière à amener les molécules restantes dans un four. La combustion catalytique à 680°C permet la combustion complète de l'échantillon par le chauffage à haute température dans un environnement riche en oxygène (cela étant facilité par l'emploi d'un tube à combustion rempli de catalyseur à base de platine). Le dioxyde de carbone produit est ensuite détecté par un Infra Rouge Non Dispersif (NDIR). La mesure obtenue correspond donc à un taux de carbone organique non purgeable (Non Purgeable Organic Carbon NPOC) qui peut être relié au taux en COT (en additionnant le POC). Le seuil de détection de la méthode est de 4 µg/L (ppb).

II.2.3.d.iii. SCAN COV

Un screening des COV dégagés a été réalisé à raison d'un prélèvement pour chaque désinfectant testé en condition exagérée d'utilisation (Etuves « TEST A ou B Conditions E ») ainsi que dans l'étuve témoin négatif en parallèle. Trois résultats de screening ont donc été analysés lors d'une expérimentation. Au total, cette exploration a été effectuée pendant 5 expérimentations pour obtenir n = 5 et pouvoir s'assurer d'une reproductibilité des résultats de ces screenings.

L’air de l’étuve a été capté par pompage actif à l’aide de pompes type GILAIR® à débit réglé (50 mL/min) à l’intérieur d’un tube TENAX® contenant du charbon activé, capable d’adsorber les COV. Immédiatement après les 24h d’incubation et de pompage, les tube TENAX® des 3 étuves étudiées ont été refermés et stockés dans un flacon de verre hermétique soustrait de la lumière, entre +2°C et +8°C avant envoi rapide au Laboratoire d’Étude et de Recherche en Environnement et Santé (LERES) de Rennes.

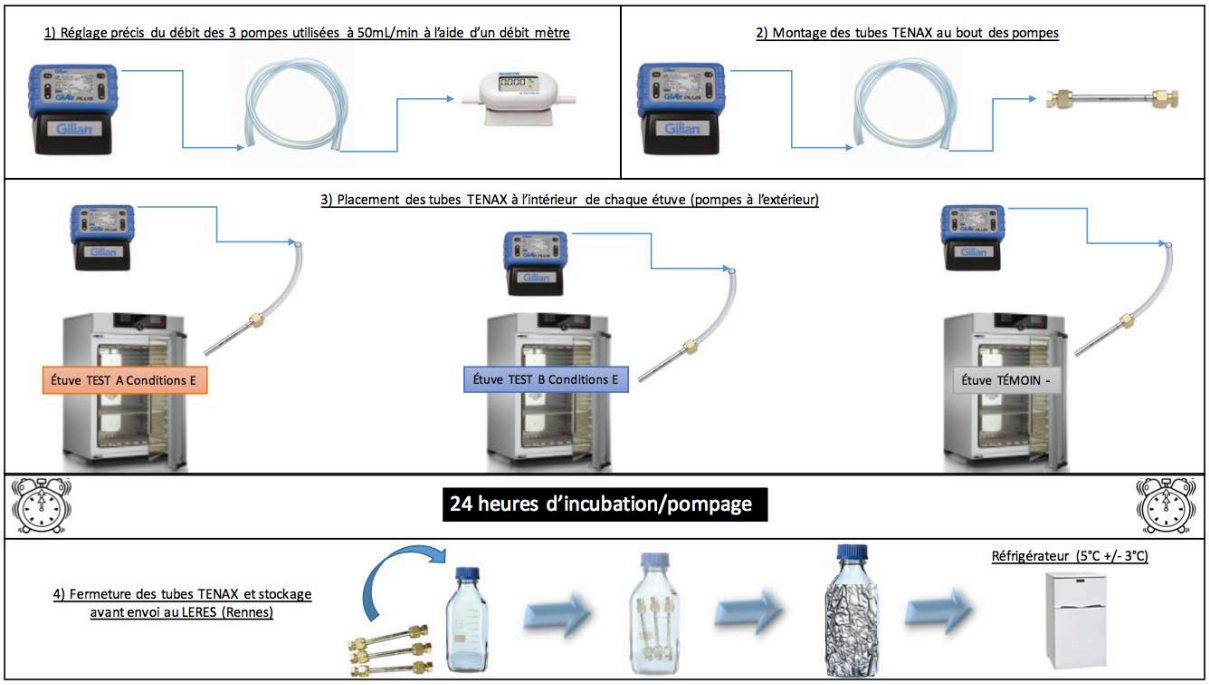


Figure 24 : Mode opératoire pour prélèvement d'air en vue d'un screening des COV

Au LERES (laboratoire faisant parti de l’École des Hautes Études en Santé Publique (EHESP) de Rennes), après réception des tubes TENAX®, ceux-ci ont subi une désorption thermique à l’aide d’un thermodésorbeur (TurboMatrix 150 – Perkin Elmer). Les tubes ont été chauffés un par un à très haute température permettant ainsi une première désorption appelée désorption primaire. Les molécules ainsi désorbées ont été piégées à froid sur un piège situé dans le thermodésorbeur. Ce piège a ensuite été lui aussi chauffé pour permettre une désorption secondaire. Les molécules désorbées ont ainsi été transportées par un gaz vecteur dans la ligne de transfert du thermodésorbeur jusqu’à la colonne de CPG (modèle 7890A – Agilent Technologies) et enfin la SM (modèle 5975C with Triple Axis Detector – Agilent Technologies).

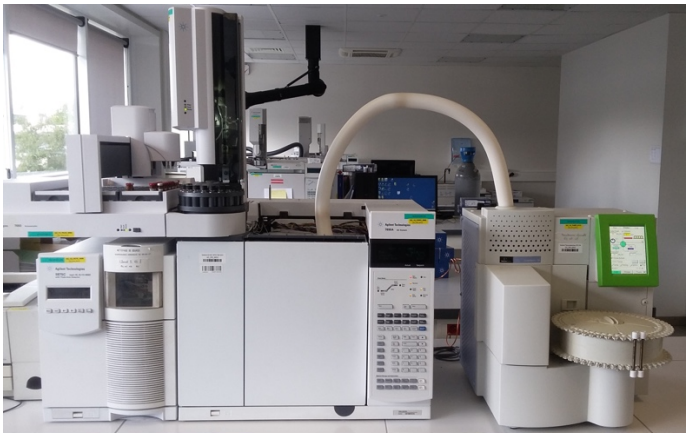


Figure 25 : Thermodésorbeur couplé CPG-SM - LERES Rennes

L'annexe II présente une figure résumant l'ensemble du mode opératoire de l'étude BIONETTOX-FIV.

II.3. Résultats

II.3.1. Analyses spermatiques

Le tableau en annexe III présente une feuille de travail type, complétée lors de l'expérimentation n°3. Une feuille de travail a été complétée de la même manière pour chacune des 10 expérimentations.

Le tableau ci-après montre les valeurs des différents SpST index pour l'ensemble de l'étude BIONETTOX-FIV. Les cases du tableau remplies en vert correspondent à un SpST index supérieur ou égal à 0,85 (non repro-toxique) tandis que les cases remplies en rouge correspondent à un SpST index inférieur à 0,85 (repro-toxique). Pour 3 prélèvements, une bactériospermie inhérente au sperme de base a été constatée. Les lignes « #DIV/0! » correspondent donc à ces prélèvements où les résultats étaient inutilisables puisque tous les spermatozoïdes étaient morts après les 24h d'incubation en raison de la présence bactérienne (bactéries visibles à l'examen direct au microscope d'une goutte de sperme entre lame et lamelle).

Tableau 11 : SpST index - étude BIONETTOX-FIV

			SpST index			
			Etuve TEST A Conditions E	Etuve TEST A Conditions N	Etuve TEST B Conditions E	Etuve TEST B Conditions N
Exp 1	Sperme 1	Puit 1	0,888888889	0,944444444	0,814814815	1
		Puit 2 (huile)	0,916666667	1,166666667	1,291666667	1,25
	Sperme 2	Puit 3	0,909090909	0,945454545	0,872727273	1,272727273
		Puit 4 (huile)	1,033333333	1,083333333	0,783333333	1,15
Exp 2	Sperme 1	Puit 1	0,391304348	1	0,782608696	1,217391304
		Puit 2 (huile)	0,730769231	0,961538462	0,692307692	1
	Sperme 2	Puit 3	0,46	1,28	0,6	0,88
		Puit 4 (huile)	0,466666667	1,1	0,533333333	0,9
Exp 3	Sperme 1	Puit 1	1,1	0,95	1,2	0,95
		Puit 2 (huile)	0,875	1	1,0625	1,09375
	Sperme 2	Puit 3	1,2	1,169230769	1,292307692	1,169230769
		Puit 4 (huile)	1,02739726	1,02739726	1,232876712	1,082191781
Exp 4	Sperme 1	Puit 1	1,155555556	1,355555556	1,711111111	1,488888889
		Puit 2 (huile)	0,75	0,911764706	1,073529412	1,029411765
	Sperme 2	Puit 3	1,244444444	1,155555556	1,044444444	1,333333333
		Puit 4 (huile)	1,290322581	1,177419355	0,983870968	0,983870968
Exp 5	Sperme 1	Puit 1	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		Puit 2 (huile)	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
	Sperme 2	Puit 3	0,777777778	0,777777778	0,555555556	1,055555556
		Puit 4 (huile)	1,035714286	1,196428571	1,142857143	1,339285714
Exp 6	Sperme 1	Puit 1	0,985294118	1,014705882	1,029411765	1,176470588
		Puit 2 (huile)	1,052631579	1,105263158	1,026315789	1,118421053
	Sperme 2	Puit 3	0,875	0,892857143	0,982142857	0,928571429
		Puit 4 (huile)	1,28358209	1,179104478	1,164179104	1,134328358
Exp 7	Sperme 1	Puit 1	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		Puit 2 (huile)	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
	Sperme 2	Puit 3	1,051282051	0,871794872	1,051282051	0,974358974
		Puit 4 (huile)	0,98	1,06	1,04	0,98
Exp 8	Sperme 1	Puit 1	1,272727273	1,159090909	1,204545455	1,181818182
		Puit 2 (huile)	1	1,111111111	1,018518519	0,962962963
	Sperme 2	Puit 3	1,177419355	0,887096774	1,209677419	1,225806452
		Puit 4 (huile)	0,905405405	0,918918919	1,067567568	1,148648649
Exp 9	Sperme 1	Puit 1	1,015625	0,859375	1,125	1,203125
		Puit 2 (huile)	1,092105263	1,013157895	1,118421053	1,039473684
	Sperme 2	Puit 3	1	0,967741935	1,129032258	1,209677419
		Puit 4 (huile)	1,142857143	1,157142857	1,2	1,142857143
Exp 10	Sperme 1	Puit 1	0,942857143	1	1,142857143	1
		Puit 2 (huile)	0,973333333	1,066666667	1,106666667	1,106666667
	Sperme 2	Puit 3	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
		Puit 4 (huile)	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Les graphes ci-après présentent les résultats des différentes séries de valeurs avec les barres de moyenne et d'écart-type. Les graphes avec * présentent des résultats significativement différents de 0,85 (test t de Student (unilatéral) pour petits échantillons ou test non paramétrique de Wilcoxon suivant la distribution gaussienne ou non de la série de valeurs en question).

II.3.1.a. Étuves « TEST Conditions N » conditions normales d'utilisation

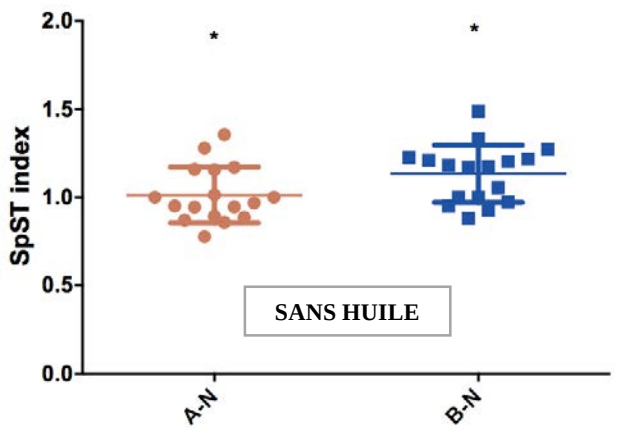


Figure 26 : Résultats SpST index étuves TEST Conditions N (sans huile)

Les séries de valeurs des $SpST_{(A-N)}$ et $SpST_{(B-N)}$ suivent une loi Gaussienne d'après les tests de normalité de Kolmogorov-Smirnov et de Shapiro-Wilk.

Les résultats suivants sont observables :

- La moyenne des $SpST_{(A-N)}$ est 1,014, avec un écart-type de 0,158. Ce résultat est significativement différent de 0,85 selon le test t de Student ($p = 0,0006$) ;
- La moyenne des $SpST_{(B-N)}$ est 1,133 avec un écart-type de 0,1628. Ce résultat est significativement différent de 0,85 selon le test t de Student ($p < 0,0001$) ;
- Les moyennes des $SpST_{(A-N)}$ et $SpST_{(B-N)}$ sont significativement différentes selon le test t de Student ($p = 0,0153$).

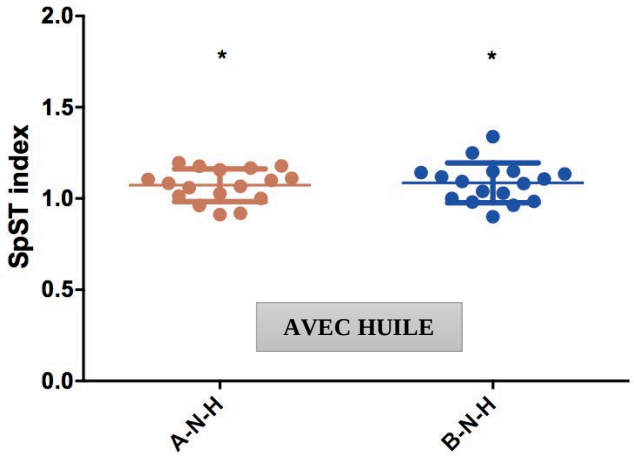


Figure 27 : Résultats SpST index étuves TEST Conditions N (avec huile)

Les séries de valeurs des $SpST_{(A-N-H)}$ et $SpST_{(B-N-H)}$ suivent une loi Gaussienne d'après les tests de normalité de Kolmogorov-Smirnov et de Shapiro-Wilk.

Les résultats suivants sont observables :

- La moyenne des $SpST_{(A-N-H)}$ est 1,073, avec un écart-type de 0,09012. Ce résultat est significativement différent de 0,85 selon le test t de Student ($p < 0,0001$) ;
- La moyenne des $SpST_{(B-N-H)}$ est 1,086 avec un écart-type de 0,1091. Ce résultat est significativement différent de 0,85 selon le test t de Student ($p < 0,0001$) ;
- Les moyennes des $SpST_{(A-N-H)}$ et $SpST_{(B-N-H)}$ ne sont pas significativement différentes selon le test t de Student ($p = 0,6459$).

Par ailleurs, pour l'étuve TEST A Conditions N, les valeurs moyennes des $SpST_{(A-N)}$ et $SpST_{(A-N-H)}$ ne sont pas significativement différentes selon le test t de Student ($p = 0,2373$). Pour l'étuve TEST B Conditions N, les valeurs moyennes des $SpST_{(B-N)}$ et $SpST_{(B-N-H)}$ ne sont pas significativement différentes selon le test t de Student ($p = 0,3546$).

II.3.1.b. Étuves « TEST Conditions E » conditions exagérées (atmosphères saturées)

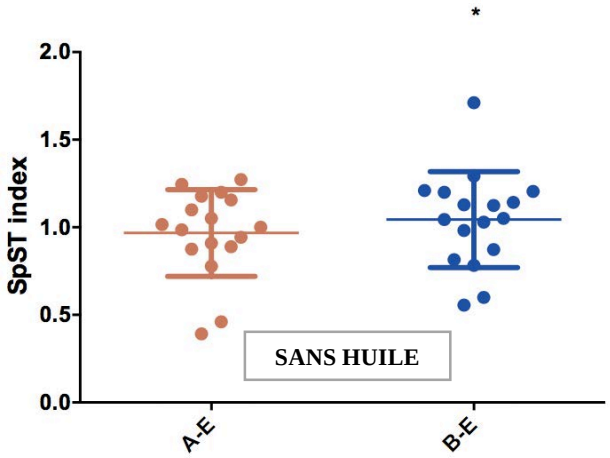


Figure 28 : Résultats SpST index étuves TEST Conditions E (sans huile)

Les séries de valeurs des $SpST_{(A-E)}$ et $SpST_{(B-E)}$ suivent une loi Gaussienne d'après les tests de normalité de Kolmogorov-Smirnov et de Shapiro-Wilk.

Les résultats suivants sont observables :

- La moyenne des $SpST_{(A-E)}$ est 0,9675, avec un écart-type de 0,247. Ce résultat n'est pas significativement différent de 0,85 selon le test t de Student (p = 0,0675) ;
- La moyenne des $SpST_{(B-E)}$ est 1,044 avec un écart-type de 0,2736. Ce résultat est significativement différent de 0,85 selon le test t de Student (p = 0,01) ;
- Les moyennes des $SpST_{(A-E)}$ et $SpST_{(B-E)}$ ne sont pas significativement différentes selon le test t de Student (p = 0,1184).

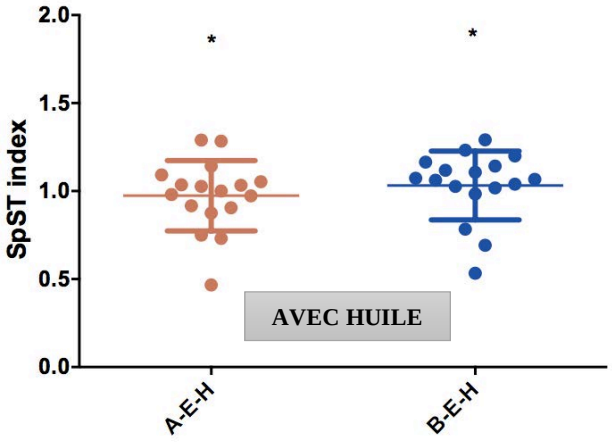


Figure 29 : Résultats SpST index étuves TEST Conditions E (avec huile)

La série de valeurs des $SpST_{(A-E-H)}$ suit une loi Gaussienne d'après les tests de normalité de Kolmogorov-Smirnov et de Shapiro-Wilk. En revanche, la série de valeurs des $SpST_{(B-E-H)}$ ne suit pas une loi Gaussienne d'après les tests de normalité de Kolmogorov-Smirnov et de Shapiro-Wilk.

Les résultats suivants sont observables :

- La moyenne des $SpST_{(A\text{-}E\text{-}H)}$ est 0,9739, avec un écart-type de 0,2. Ce résultat est significativement différent de 0,85 selon le test t de Student (p = 0,0212) ;
- La moyenne des $SpST_{(B\text{-}E\text{-}H)}$ est 1,032 avec un écart-type de 0,1955. La médiane est de 1,068. Ce résultat est significativement différent de 0,85 selon le test non paramétrique de Wilcoxon (p = 0,0038) ;
- Les moyennes des $SpST_{(A\text{-}E\text{-}H)}$ et $SpST_{(B\text{-}E\text{-}H)}$ ne sont pas significativement différentes selon le test non paramétrique de Wilcoxon (p = 0,1355).

Par ailleurs, pour l'étuve TEST A Conditions E, les valeurs moyennes des $SpST_{(A\text{-}E)}$ et $SpST_{(A\text{-}E\text{-}H)}$ ne sont pas significativement différentes selon le test t de Student (p = 0,9076). Pour l'étuve TEST B Conditions E, les valeurs moyennes des $SpST_{(B\text{-}E)}$ et $SpST_{(B\text{-}E\text{-}H)}$ ne sont pas significativement différentes selon le test non paramétrique de Wilcoxon (p = 0,2633).

II.3.2. Mesures du taux de COV total

Tableau 12 : Synthèse des mesures du taux de COV total (VOC-mètre ppbRAE3000)

		Etuve Témoin négatif	Etuve TEST A Conditions E	Etuve TEST A Conditions N	Etuve TEST B Conditions E	Etuve TEST B Conditions N
Exp 1	Avant incubation	170 ppb	164 ppb	166 ppb	166 ppb	168 ppb
	Après incubation	165 ppb	200 ppb	188 ppb	192 ppb	184 ppb
Exp 2	Avant incubation	245 ppb	253 ppb	245 ppb	244 ppb	245 ppb
	Après incubation	251 ppb	254 ppb	261 ppb	255 ppb	254 ppb
Exp 3	Avant incubation	308 ppb	320 ppb	306 ppb	310 ppb	303 ppb
	Après incubation	298 ppb	305 ppb	284 ppb	300 ppb	273 ppb
Exp 4	Avant incubation	276 ppb	240 ppb	256 ppb	243 ppb	283 ppb
	Après incubation	224 ppb	192 ppb	194 ppb	187 ppb	202 ppb
Exp 5	Avant incubation	187 ppb	180 ppb	183 ppb	175 ppb	181 ppb
	Après incubation	220 ppb	200 ppb	201 ppb	200 ppb	226 ppb
Exp 6	Avant incubation	246 ppb	252 ppb	241 ppb	246 ppb	261 ppb
	Après incubation	268 ppb	227 ppb	227 ppb	218 ppb	241 ppb
Exp 7	Avant incubation	235 ppb	215 ppb	215 ppb	207 ppb	235 ppb
	Après incubation	243 ppb	200 ppb	201 ppb	189 ppb	211 ppb
Exp 8	Avant incubation	205 ppb	205 ppb	204 ppb	203 ppb	206 ppb
	Après incubation	262 ppb	226 ppb	223 ppb	210 ppb	253 ppb
Exp 9	Avant incubation	346 ppb	333 ppb	361 ppb	331 ppb	338 ppb
	Après incubation	305 ppb	273 ppb	278 ppb	257 ppb	293 ppb
Exp 10	Avant incubation	230 ppb	216 ppb	221 ppb	215 ppb	213 ppb
	Après incubation	228 ppb	199 ppb	200 ppb	195 ppb	222 ppb

II.3.3. Mesures du COT

Tableau 13 : Résultats des mesures de COT (NPOC)

Résultats en ppb de Carbone	Expérimentation n°2	Expérimentation n°3	Expérimentation n°4	Expérimentation n°5	Expérimentation n°8
	Moyenne obtenue	Moyenne obtenue	Moyenne obtenue	Moyenne obtenue	Moyenne obtenue
Produit A	251,9	356,5	272,3	249,1	257,9
Produit B	246,5	244,9	330,0	280,3	352,6
Témoin Négatif	343,8	277,9	322,0	325,5	240,8

Pour chaque expérimentation, les échantillons ont été analysés deux fois sur l'appareil Shimadzu afin de vérifier la reproductibilité des résultats. Le tableau ci-dessus présente la moyenne des deux résultats pour chaque produit et expérimentation.

La moyenne des échantillons blancs mesurés (eau UltraPure (UP)) était de 114,9 ppb.

II.3.4. SCAN COV

II.3.4.a. Tube témoin blanc

Le jour de la première expérimentation où les analyses avec tubes TENAX® ont commencé, un tube témoin blanc (tube TENAX® également) a été ouvert et laissé dans la pièce des étuves où se sont déroulées les expérimentations. Ce tube a capté passivement l'ensemble des COV de la pièce pendant toute la durée des expérimentations. Il a permis d'identifier les composés présents.

Les critères acceptables pour la reconnaissance des composés par la bibliothèque sont les suivants : il faut un Reverse Match Factor (RMF) > 800 et une concordance entre le spectre inconnu et le spectre de la bibliothèque. Le critère sur le RMF peut être élargi au cas par cas lorsque le temps de rétention du pic correspond à celui d'une molécule connue analysée au laboratoire lors des analyses quantitatives réalisées avec le même programme thermique du four GC.

Un exemple de spectre obtenu est disponible en annexe IV. Le spectre présenté est celui du tube témoin blanc. Le tableau suivant présente les résultats de l'analyse effectuée par le LERES pour l'identification des différents pics du spectre obtenu pour le tube témoin blanc.

Tableau 14 : COV présents dans la tube témoin blanc (SCAN COV - LERES Rennes)

N° pic	Tr (min)	Résultats de la recherche en bibliothèque
1	4,46	Ethanol (RMF= 936)
2	5,15	Acétone (RMF= 963)
3	5,40	2-propanol (RMF= 935)
4	8,13	2-butanone (RMF= 948)
5	9,47	Acide acétique (RMF= 956) ou acétate d'ammonium (RMF=873)
6	10,48	1-butanol (RMF= 910)
7	12,67	Toluène (RMF= 944)
8	13,87	Hexanal (RMF= 849)
9	15,10	Ethylbenzène (RMF= 937)
10	15,30	m et/ou p-xylène (RMF= 952)
11	15,93	o-xylène (RMF= 848)
12	16,47	2-butoxyéthanol (RMF= 896)
13	16,53	Famille des terpènes (3-carène RMF= 903)
14	17,08	1-butoxypropanol (RMF= 924)
15	18,20	Acétophénone (RMF= 812)
16	18,70	Limonène (RMF= 945)
17	19,79	Undécane (RMF= 940)
18	20,84	Nonanal (RMF= 888)
19	21,70	Dodécane (RMF= 950)
20	23,05	Tridécane (RMF= 953)
21	24,11	Tetradécane (RMF= 940)
22	25,13	Dérivé phénylique : 2,6-diphénylphénol (RMF = 927) 6,6-diphényl-bicyclo[3.1.0]hex-3-èn-2-one (RMF =874) 4,4-diphényl-2,5-cyclohexadiènone (RMF = 849)

II.3.4.b. Tubes étuves produit A, produit B et témoin négatif

Les prélèvements ont eu lieu pendant les cinq premières expérimentations. Les critères acceptables pour la reconnaissance des composés par la bibliothèque sont les mêmes que ceux évoqués précédemment pour le tube témoin blanc. Pour chaque étuve analysée, les 5 tubes prélevés dans les mêmes conditions présentent les mêmes pics chromatographiques (spectres non présentés ici), sauf les pics à 3,93, 4,20, 4,34, 4,43, 6,10 et 14,97 minutes qui ne sont présents que dans la série de l'expérimentation n°1 pour les étuves témoin négatif et produit A. Les composés présents dans les tubes issus de l'étuve témoin négatif sont également présents dans les tubes issus des étuves produit A et produit B. Les composés supplémentaires avec l'utilisation des produits A ou B sont indiqués dans les dernières colonnes du tableau suivant. Certains composés sont présents à la fois dans les tubes issus des étuves et dans le tube témoin blanc. Leur présence dans le tube témoin blanc est négligeable par rapport à leur abondance dans les tubes issus des prélèvements dans les étuves.

Tableau 15 : Tableau global des résultats SCAN COV (partie 1/2)

N° pic	Tr (min) Référence = chromatogramme du 1er "Etuve témoin négatif"	Résultats de la recherche en bibliothèque sur "Etuve témoin négatif" (nettoyage à l'eau)	Utilisation du produit A	Utilisation du produit B
1	3,93	2-méthylbutane (RMF= 960)	2-méthylbutane	2-méthylbutane
2	4,20	Trichloromonoflurorométhane (RMF= 963)	Trichloromonoflurorométhane	Trichloromonoflurorométhane
3	4,34	Pentane (RMF= 953)	Pentane	Pentane
4	4,43	Ethanol (RMF= 959)	Ethanol	Ethanol
5	5,10	Acétone (RMF= 927)	Acétone	Acétone
6	6,10	2-méthylpropanol (RMF= 916)	2-méthylpropanol	2-méthylpropanol
7	9,45	Acide acétique (RMF= 918) ou acétate d'ammonium (RMF= 852)	Acide acétique ou acétate d'ammonium	Acide acétique ou acétate d'ammonium
8	10,02	Heptane (RMF= 921)	Heptane	Heptane
9	10,44	1-butanol (RMF= 925)	1-butanol	1-butanol
10	11,63	2-éthoxyéthanol (RMF= 914)	2-éthoxyéthanol	2-éthoxyéthanol
11	12,65	Toluène (RMF= 924)	Toluène	Toluène
12	12,86	Octane (RMF= 916)	Octane	Octane
A	13,71			Propylène glycol (RMF= 954)
13	13,85	Hexanal (RMF= 831)	Hexanal	Hexanal
14	14,97	3-méthoxybutanol (RMF= 924)	3-méthoxybutanol	3-méthoxybutanol
15	15,08	Ethylbenzène (RMF= 933)	Ethylbenzène	Ethylbenzène
16	15,28	m et/ou p-xylène (RMF= 949)	m et/ou p-xylène	m et/ou p-xylène
17	15,91	o-xylène (RMF= 835)	o-xylène	o-xylène
18	16,46	2-butoxyéthanol (RMF= 905)	2-butoxyéthanol	2-butoxyéthanol
19	17,06	1-butoxy-2-propanol (RMF= 926)	1-butoxy-2-propanol	1-butoxy-2-propanol
20	17,51	Décane (RMF= 959)	Décane	Décane
21	18,17	Acétophénone (RMF= 814)	Acétophénone	Acétophénone
22	18,68	Limonène (RMF= 936)	Limonène	Limonène
23	19,17	Famille des alcools (nombre de C = 8) Plusieurs spectres concordants avec RMF>800	Famille des alcools (nombre de C = 8) Plusieurs spectres concordants	Famille des alcools (nombre de C = 8) Plusieurs spectres concordants
24	19,78	Undécane (RMF= 932)	Undécane	Undécane
25	20,83	Trans-4a-méthyl-décahydronaphtalène (RMF= 825)	Trans-4a-méthyl-décahydronaphtalène	Trans-4a-méthyl-décahydronaphtalène

Tableau 16 : Tableau global des résultats SCAN COV (partie 2/2)

26	21,10	Alcane substitué ou non Plusieurs spectres concordants avec RMF>800	Alcane substitué ou non Plusieurs spectres concordants	Alcane substitué ou non Plusieurs spectres concordants
27	21,24	Alcane substitué ou non Plusieurs spectres concordants avec RMF>800	Alcane substitué ou non Plusieurs spectres concordants avec	Alcane substitué ou non Plusieurs spectres concordants avec
28	21,72	Dodécane (RMF= 950)	Dodécane (RMF= 950)	Dodécane (RMF= 950)
29	21,91	Alcane substitué ou non Plusieurs spectres concordants avec RMF>800	Alcane substitué ou non Plusieurs spectres concordants	Alcane substitué ou non Plusieurs spectres concordants
30	22,02	Famille des alcools Plusieurs spectres concordants avec RMF>800	Famille des alcools Plusieurs spectres concordants	Famille des alcools Plusieurs spectres concordants
31	22,46	2,3-diméthyldécane (RMF= 893)	2,3-diméthyldécane	2,3-diméthyldécane
32	22,57	Hexyl-cyclohexane (RMF= 889)	Hexyl-cyclohexane	Hexyl-cyclohexane
33	22,71	Spectres peu concordants	Spectres peu concordants	Spectres peu concordants
34	23,04	Tridécane (RMF= 940)	Tridécane	Tridécane
B	23,26		1-undecanol (RMF= 901)	
35	24,09	Tétradécane (RMF= 910)	Tétradécane	Tétradécane
C	25,1		Dérivé phénylique : 2,6-diphénylphénol (RMF= 931) 6,6-diphényl-bicyclo[3.1.0]hex-3-èn-2-one (RMF= 890) 4,4-diphényl-2,5-cyclohexadiènone (RMF= 853)	

composés communs au blanc	pics non communs avec l'échantillon "étuve témoin"

DISCUSSION

BIONETTOX-FIV cherche à évaluer l'impact indirect potentiel de produits de bionettoyage sur des spermatozoïdes humains. Dans la littérature, l'unique étude s'intéressant à un impact de produit désinfectant en laboratoire d'AMP est une publication/poster de Chang *et al*. (156,157). Les auteurs y présentent leurs travaux réalisés pour prouver l'absence de toxicité du produit de bionettoyage Oosafe® (produit repris dans notre étude). Comme BIONETTOX-FIV, l'étude de Chang utilise un test SpST après incubation en boites NUNC® 4 puits et utilise l'alcool comme témoin positif. En revanche, Chang *et al*. semblent avoir directement appliqué le produit pour nettoyer les boites NUNC® 4 puits utilisées. Ainsi, les auteurs évaluent un impact direct d'Oosafe® sur les spermatozoïdes alors que BIONETTOX-FIV évalue un impact indirect des produits de biodécontamination. De plus, dans leur étude, la condition « immersion sous huile minérale de la préparation » n'a pas été testée et la survie spermatique a été observée à 24, 48 et 72h après une incubation dans une étuve tri-gaz à 37°C d'une part, et à température ambiante d'autre part (156,157). L'originalité de notre étude réside dans le mode opératoire proposé avec étuves et incubation des spermatozoïdes en boite NUNC® afin de permettre un impact indirect d'une substance appliquée dans l'étuve. Par ailleurs, la réalisation de prélèvements/analyses chimiques selon différentes technologies a permis d'évaluer les composés chimiques libérés et potentiellement à l'origine d'un impact sur les spermatozoïdes incubés.

Concernant les analyses spermatiques, BIONETTOX-FIV a permis de mettre en évidence que les différents SpST index moyens calculés sont tous significativement différents de 0,85, seuil de repro-toxicité utilisé selon la littérature (18), à l'exception du $SpST_{(A-E)}$ moyen obtenu dans l'étuve TEST A Conditions E (atmosphère saturée) pour les puits sans huile minérale. La valeur moyenne du $SpST_{(A-E)}$ de 0,9675 reste toutefois éloignée du seuil de toxicité. Ainsi, il semble que les produits de bionettoyage étudiés (Surfa'safe® et Oosafe®) ne présentent pas de repro-toxicité sur les spermatozoïdes humains, et ceci quelles que soient les conditions d'incubation : atmosphère saturée ou conditions d'utilisation professionnelle avec rinçage à l'eau d'une part, et avec ou sans huile minérale d'autre part. En cela, cette observation rejoint la conclusion du travail de Chang *et al*. qui constatent une absence de repro-toxicité directe du produit Oosafe® (avec un seuil de repro-toxicité à 0,75 choisi par les auteurs) (156,157). Cependant, il est important de souligner que le Human Sperm Survival Assay ou Sperm Survival Test s'intéresse uniquement à un éventuel impact fonctionnel (et plus précisément sur la mobilité spermatique). Aucune conclusion ne peut être faite concernant une innocuité complète d'utilisation car cette étude n'élimine pas un éventuel impact sur l'ADN des spermatozoïdes (fragmentation de l'ADN engendrée par des COV mise en évidence dans certaines publications (124)), ou encore un impact épigénétique.

Nous avons également observé que les valeurs moyennes des SpST index des étuves TEST Conditions N sont toutes supérieures aux valeurs moyennes des SpST index des étuves TEST Conditions E, pour chaque condition comparable ($SpST_{(A-E)}$ vs $SpST_{(A-N)}$; $SpST_{(B-E-H)}$ vs $SpST_{(B-N-H)}$ etc.). Cependant, une seule comparaison est statistiquement significative : la

valeur moyenne $SpST_{(A-N-H)}$ est significativement différente de la valeur moyenne $SpST_{(A-E-H)}$ selon le test t de Student ($p = 0,032$). Ainsi, il semble que l'atmosphère saturée en produit n'ait pas altéré la mobilité spermatique comme supposé au départ. Cette constatation va également dans le sens d'une absence de repro-toxicité des produits étudiés.

Dans notre étude BIONETTOX-FIV, nous avons souhaité inclure une condition d'incubation avec recouvrement par huile minérale car l'huile est un élément majeur dans les pratiques courantes de culture embryonnaire en laboratoire d'AMP. En raison des faibles volumes de milieu de culture utilisés, l'ajout d'une couche d'huile minérale est indispensable pour prévenir une évaporation et empêcher une hyperosmolarité du milieu de culture embryonnaire. Cette couche d'huile assure aussi le maintien d'un pH stable en évitant des oscillations liées à une incubation longue (3). L'huile doit être de qualité suffisante afin de ne pas altérer la survie embryonnaire. Karagouga *et al*. montrent que la toxicité d'une huile de mauvaise qualité (avec des concentrations conséquentes en peroxydes) est d'autant plus importante qu'il existe un effet additif avec un air de mauvaise qualité, riche en COV (158). Dans notre étude BIONETTOX-FIV et au vu des résultats, l'huile minérale n'apporte aucun bénéfice significatif ni aucun impact délétère sur la survie spermatique.

Concernant la comparaison entre les produits Surfa'safe® et Oosafe®, les différents SpST index moyens calculés ne sont pas significativement différents selon les conditions comparables : $SpST_{(A-E)}$ vs $SpST_{(B-E)}$, $SpST_{(A-E-H)}$ vs $SpST_{(B-E-H)}$ et $SpST_{(A-N-H)}$ vs $SpST_{(B-N-H)}$. La seule comparaison significativement différente est la comparaison entre $SpST_{(A-N)}$ vs $SpST_{(B-N)}$. Il semble donc n'y avoir aucune différence entre les deux produits d'un point de vue reprotoxique.

Au vu des résultats des survies spermatiques, l'objectif secondaire relatif à l'évaluation de l'impact des 2 produits sur la vitalité spermatique n'a pas été réalisé. En effet, le pourcentage de spermatozoïdes de classe « d » (immobiles) a dans la quasi-totalité des cas été inférieur à 42%. Toutefois, cette analyse a été réalisée à 3 reprises. Tout d'abord, lors de l'expérimentation n°5 pour le puit sans huile du sperme 2 de l'étuve TEST B Conditions E, où le pourcentage de spermatozoïdes de classe « d » était de 48%. Une vitalité de 54% avait alors été mise en évidence (vitalité sub-normale pour un sperme sachant que la norme de l'OMS indique une vitalité considérée normale si supérieure à 58%). Ensuite, la vitalité spermatique a été réalisée lors des expérimentations n°5 et 7 (pour le sperme n°1) et enfin lors de l'expérimentation n°10 (pour le sperme n°2) pour tous les puits de ces spermes dans les différentes étuves, afin d'expliquer un pourcentage de spermatozoïdes de classe « d » de 100%. Ces vitalités étaient de 0% à chaque fois, amenant à la conclusion d'une nécrospermie. Cela s'expliquait par la présence de bactéries (visibles à l'examen direct), inhérente à des bactériospermies initiales des différents spermes, comme expliqué dans la partie Résultats. Enfin, en raison d'un pourcentage de spermatozoïdes de classe « d » supérieur à 42%, la vitalité spermatique aurait dû être évaluée lors de l'expérimentation n°2 pour les différents puits des étuves TEST A et B Conditions E des deux spermes incubés ce jour. Cependant, les spermes étant sub-normaux en concentration, une quantité insuffisante de spermatozoïdes dans les différents puits a rendu l'analyse non réalisable (une analyse pertinente nécessitant au moins 100 spermatozoïdes).

En ce qui concerne les mesures réalisées à l'aide du VOC-mètre ppbRAE3000, d'importantes différences ont été observées suivant les jours d'expérimentation. Les taux (à J0) varient de 160 ppb environ à plus de 300 ppb selon le jour d'incubation. Une possible explication de ces taux de base réside dans la mauvaise ventilation du local où se déroulaient les expérimentations et par ailleurs, par la réalisation de travaux au même étage du bâtiment, peu de temps avant notre étude.



Figure 30 : Pièce des étuves (laboratoire DHREAS - Faculté de Médecine de Nancy)

Nous pouvons penser que ces travaux ainsi que les nouveaux matériaux déposés (linoléum etc.) ont entrainé une augmentation du taux moyen de COV au sein du laboratoire, comme évoqué dans la littérature (82,86,89). Les mesures effectuées avec le VOC-mètre indiquent une quantité de COV libérés pendant les 24 heures d'incubation au sein d'une étuve. Notre hypothèse initiale était que la saturation en vapeurs de produit décontaminant induirait un taux de COV plus important après les 24 heures d'incubation. Cette hypothèse ne s'est pas vérifiée. Ainsi, les taux de COV mesurés sont parfois inférieurs après incubation. Cependant, il est à noter qu'un échappement des composés libérés est possible. En effet, les étuves ne sont pas tout à fait hermétiques de par la présence de systèmes pour y connecter des bonbonnes de gaz. Les résultats de cette analyse chimique ne permettent donc pas de conclure quant à un dégagement conséquent de COV suite à l'utilisation des produits de bionettoyage étudiés dans les étuves utilisées.

Les mesures du taux de COT réalisées à Sainghin-en-Mélantois sont en adéquation avec la conclusion des analyses menées via le VOC-mètre. En effet, les taux moyens observés varient de 250 à 350 ppb, ce qui correspond à un même ordre de grandeur. Il s'agit là d'une mesure témoignant d'une condensation sur un verre de montre de différents composés organiques pendant les 24h d'incubation. L'hypothèse initiale était que les étuves à atmosphère saturée en produit présenteraient un dépôt plus important en composés organiques que l'étuve témoin négatif. Les résultats sont finalement équivalents entre les différentes étuves, avec parfois même des taux plus importants dans l'étuve témoin négatif. Ainsi, en tenant compte de cette

analyse d'une part, et parallèlement de l'analyse « aérienne » via les mesures du VOC-mètre ppbRAE3000 d'autre part, il semble que l'utilisation des produits de bionettoyage Surfa'safe® et Oosafe® ne s'accompagne pas d'une libération majeure de composés organiques, même quand ces produits sont appliqués de manière excessive.

Les analyses sous-traitées et réalisées à Rennes au laboratoire LERES permettent de mettre en évidence de manière qualitative les composés chimiques libérés en fonction du produit étudié. Les résultats sont très reproductibles au vu des chromatographes obtenus durant les 5 incubations pendant lesquelles les prélèvements d'air ont été réalisés, et ceci pour chaque étuve analysée (étuve TEST A Conditions E, étuve TEST B Conditions E et étuve témoin négatif). Après élimination du bruit de fond (via le tube blanc ouvert tout au long des expérimentations) et des molécules retrouvées de manière commune dans les 3 étuves, les composés suivants sont retrouvés de façon spécifique : du propylène glycol (pic A avec temps de rétention à 13,71 min) retrouvé uniquement dans l'étuve TEST B Conditions E avec atmosphère saturée en Oosafe®, du 1-undecanol (pic B avec temps de rétention à 23,26 min) observé uniquement dans l'étuve TEST A Conditions E avec atmosphère saturée en Surfa'safe®. Enfin, des composés type dérivés phényliques (2,6-diphénylphénol, 6,6-diphényl-bicyclo[3.1.0]hex-3-èn-2-one et 4,4-diphényl-2,5-cyclohexadiènone, pic C avec temps de rétention à 25,1 min) sont retrouvés dans les 2 étuves TEST A et B Conditions E mais pas dans l'étuve témoin négatif. Ces résultats chimiques montrent un dégagement de COV spécifique en fonction du produit. Toutefois, malgré cette conclusion chimique, aucun taux fort en COV n'a été retrouvé via l'analyse avec le VOC-mètre et la mesure du COT. Par ailleurs, aucun impact spermatique n'est constaté via l'étude des index SpST. Ceci renforce alors l'idée d'une utilisation « reprosafe » de ces deux produits car les quelques COV spécifiques dégagés ne s'accumulent pas en taux importants dans notre étude et n'impactent pas les spermatozoïdes humains. Enfin, les COV retrouvés diffèrent en fonction du produit. Ceci peut logiquement s'expliquer par une différence de composition chimique des produits de bionettoyage étudiés.

Cette conclusion rassurante doit être modérée. En effet, différents biais existent dans notre étude BIONETTOX-FIV. Le premier biais réside dans le faible nombre de préparations spermatiques utilisées (20 prélèvements). Il serait donc intéressant de poursuivre ce genre d'expérimentations pour atteindre un nombre encore plus important de prélèvements inclus. Par ailleurs, les prélèvements utilisés étaient des prélèvements normospermes selon l'OMS. Or, il paraitrait judicieux de renouveler ce mode opératoire en utilisant des prélèvements *a priori* « plus sensibles » avec certains paramètres altérés (oligospermie ou encore asthénospermie), correspondant davantage avec la réalité des patients pris en charge en AMP (3). Un autre biais réside dans la quantité de produit bionettoyant appliqué dans les étuves. En effet, cette quantité n'était pas standardisée ou mesurée et correspondait à une application globale du produit selon une méthodologie malgré tout la plus rigoureuse possible. Dans le futur, si d'autres expérimentations de ce type sont menées, il conviendrait de mesurer précisément la quantité de produit appliquée, surtout en cas de mesures chimiques. Ensuite, un important biais réside dans le taux de COV basal du laboratoire DHREAS dépourvu de ventilation efficace. Si une nouvelle étude devait se faire, il serait pertinent de la réaliser dans une pièce avec atmosphère contrôlée de type salle blanche où un taux précis et bas en COV serait maîtrisé. En effet, dans

BIONETTOX-FIV, il n'était pas envisageable d'associer à chaque expérimentation une étuve témoin positif (Ethanol 70%) en raison de la volatilité de l'alcool qui aurait risqué de modifier significativement l'atmosphère du local d'expérimentation. Enfin, une absence d'impact spermatique ne démontre pas une absence d'impact ovocytaire ou embryonnaire, sachant que l'embryon est particulièrement sensible aux COV (22).

CONCLUSION

Devant les nombreux éléments sources de stress pour les gamètes et embryons manipulés au laboratoire d'AMP, un maximum d'efforts doit être apporté pour sécuriser l'utilisation des produits ou matériaux mais aussi les pratiques effectuées dans le cadre de l'Aide Médicale à la Procréation (2,3,5).

Comme le rappellent Nijs *et al*., de nombreux tests de repro-toxicité existent pour vérifier l'absence d'impact négatif de tous les éléments en contact avec les embryons, spermatozoïdes ou ovocytes, et ceci avant leur utilisation en routine (18). Notre étude BIONETTOX –FIV a permis la mise au point d'un nouveau mode opératoire pour un test de repro-toxicité bien connu, d'une grande sensibilité et facile à mettre en place : le Sperm Survival Test (SpST). Avec l'utilisation de boite NUNC® pour l'incubation des spermatozoïdes, ceux-ci deviennent sensibles à l'action indirecte de substances présentes dans l'atmosphère de l'étuve, et de manière plus générale, dans le laboratoire. Ce nouveau test pourra donc être un indicateur d'une éventuelle repro-toxicité environnementale au laboratoire d'AMP, si il est utilisé de manière régulière en tant que contrôle qualité de l'air du laboratoire. Par ailleurs, d'autres produits bionettoyants pourront être évalués à l'aide de ce mode opératoire, comme par exemple ceux utilisés pour le bionettoyage des sols du laboratoire, ce dernier générant potentiellement de grandes quantités de COV.

Les produits de bionettoyage sont appliqués parfois quotidiennement au laboratoire et des résidus consécutifs au nettoyage peuvent persister dans les étuves, paillasses ou autres surfaces sur lesquelles ces produits sont utilisés. Il convient de sécuriser leur emploi par une connaissance parfaite d'un caractère repro-toxique ou non de ces produits, notamment lié à un dégagement de Composés Organiques Volatiles (COV). L'étude BIONETTOX-FIV met en évidence une absence d'impact spermatique fonctionnel des produits Surfa'safe® et Oosafe®. Il faut toutefois rester prudent dans cette conclusion car rien ne prouve ici une innocuité complète d'utilisation de ces produits bionettoyants. Si ces tests spermatiques ne sont pas suffisamment sensibles, il pourrait être intéressant de réaliser en parallèle une étude de repro-toxicité sur embryons murins, dérivée du Mouse Embryo Assay (MEA), mais utilisant de nouvelles technologies comme le Time-Lapse. L'étude de Wolff *et al*. démontre ainsi qu'une observation morpho-cinétique continue (Time-Lapse) du développement embryonnaire murin permet d'améliorer la sensibilité du MEA traditionnel et présente un intérêt pour la détection d'une repro-toxicité ou d'un stress *in vitro* (159).

La prise de conscience que chaque élément du laboratoire d'AMP peut être source de stress *in vitro* permettra l'amélioration future des pratiques et l'obtention de l'objectif ultime recherché dans cette spécialité : permettre à des couples inféconds de réaliser leur désir d'être parents.

REFERENCES

1. Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. Br J Obstet Gynaecol. 1980 Sep;87(9):737–56.
2. Awonuga AO, Yang Y, Rappolee DA. When Stresses Collide. Biol Reprod. 2013 Sep;89(3):74.
3. Wale PL, Gardner DK. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. Hum Reprod Update. 2016 Feb;22(1):2–22.
4. Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. Fertil Steril. 1996 Feb;65(2):349–53.
5. Xie Y, Wang F, Puscheck EE, Rappolee DA. Pipetting causes shear stress and elevation of phosphorylated stress-activated protein kinase/jun kinase in preimplantation embryos. Mol Reprod Dev. 2007 Oct;74(10):1287–94.
6. Scherrer U, Rimoldi SF, Rexhaj E, Stuber T, Duplain H, Garcin S, et al. Systemic and pulmonary vascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies. Circulation. 2012 Apr 17;125(15):1890–6.
7. Quinn P, Horstman FC. Is the mouse a good model for the human with respect to the development of the preimplantation embryo in vitro? Hum Reprod Oxf Engl. 1998 Dec;13 Suppl 4:173–83.
8. Critchlow JD, Matson PL, Newman MC, Horne G, Troup SA, Lieberman BA. Quality control in an in-vitro fertilization laboratory: use of human sperm survival studies. Hum Reprod Oxf Engl. 1989 Jul;4(5):545–9.
9. Directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains.
10. Gianaroli L, Plachot M, van Kooij R, Al-Hasani S, Dawson K, DeVos A, et al. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. Committee of the Special Interest Group on Embryology of the European Society of Human Reproduction and Embryology. Hum Reprod Oxf Engl. 2000 Oct;15(10):2241–6.
11. Higdon HL, Blackhurst DW, Boone WR. Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory. Fertil Steril. 2008 Mar 1;89(3):703–10.
12. Décret n° 2008-588 du 19 juin 2008 transposant en matière de don de gamètes et d'assistance médicale à la procréation la directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004. 2008-588 juin, 2008.
13. Arrêté du 3 août 2010 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation.
14. Arrêté du 30 juin 2017 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 modifié relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation.
15. Magli MC, Van den Abbeel E, Lundin K, Royere D, Van der Elst J, Gianaroli L. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. Hum Reprod. 2008 Jun 1;23(6):1253–62.
16. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. Revised guidelines for human

embryology and andrology laboratories. Fertil Steril. 2008 Nov 1;90(5):S45–59.
17. Iemmolo M, Simmons L, Matson P. The rapid detection of cytotoxicity using a modified human sperm survival assay. J Assist Reprod Genet. 2005 Apr;22(4):177–80.
18. Nijs M, Franssen K, Cox A, Wissmann D, Ruis H, Ombelet W. Reprotoxicity of intrauterine insemination and in vitro fertilization-embryo transfer disposables and products: a 4-year survey. Fertil Steril. 2009 Aug;92(2):527–35.
19. De Jonge CJ, Centola GM, Reed ML, Shabanowitz RB, Simon SD, Quinn P. Human sperm survival assay as a bioassay for the assisted reproductive technologies laboratory. J Androl. 2003 Feb;24(1):16–8.
20. Rinehart JS, Bavister BD, Gerrity M. Quality control in the in vitro fertilization laboratory: comparison of bioassay systems for water quality. J Vitro Fertil Embryo Transf IVF. 1988 Dec;5(6):335–42.
21. Parinaud J, Reme JM, Monrozies X, Favrin S, Sarramon MF, Pontonnier G. Mouse system quality control is necessary before the use of new material for in vitro fertilization and embryo transfer. J Vitro Fertil Embryo Transf IVF. 1987 Feb;4(1):56–8.
22. Gardner DK, Reed L, Linck D, Sheehan C, Lane M. Quality control in human in vitro fertilization. Semin Reprod Med. 2005 Nov;23(4):319–24.
23. Directive Européenne 2006/86/CE de la Commission portant application de la directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les exigences de traçabilité, la notification des réactions et incidents indésirables graves, ainsi que certaines exigences techniques relatives à la codification, à la transformation, à la conservation, au stockage et à la distribution des tissus et cellules d'origine humaine.
24. Esteves SC, Bento FC. Implementation of air quality control in reproductive laboratories in full compliance with the Brazilian Cells and Germinative Tissue Directive. Reprod Biomed Online. 2013 Jan;26(1):9–21.
25. Sogorb MA, Pamies D, de Lapuente J, Estevan C, Estévez J, Vilanova E. An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods. Toxicol Lett. 2014 Oct 15;230(2):356–67.
26. Lemeire K, Van Merris V, Cortvrindt R. The antibiotic streptomycin assessed in a battery of in vitro tests for reproductive toxicology. Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA. 2007 Oct;21(7):1348–53.
27. Van Wemmel K, Gobbers E, Eichenlaub-Ritter U, Smitz J, Cortvrindt R. Ovarian follicle bioassay reveals adverse effects of diazepam exposure upon follicle development and oocyte quality. Reprod Toxicol Elmsford N. 2005 Aug;20(2):183–93.
28. Brown NA, Spielmann H, Bechter R, Flint OP, Freeman SJ, Jelinek RJ, et al. Screening chemicals for reproductive toxicity: the current alternatives. Altern Lab Anim. 1995;23(23):868–82.
29. Cortvrindt RG, Smitz JEJ. Follicle culture in reproductive toxicology: a tool for in-vitro testing of ovarian function? Hum Reprod Update. 2002 Jun;8(3):243–54.
30. Sun F, Betzendahl I, Shen Y, Cortvrindt R, Smitz J, Eichenlaub-Ritter U. Preantral follicle culture as a novel in vitro assay in reproductive toxicology testing in mammalian oocytes. Mutagenesis. 2004 Jan 1;19(1):13–25.
31. Nogueira D, Cortvrindt R, De Matos DG, Vanhoutte L, Smitz J. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on developmental competence of immature mouse oocytes

in vitro. Biol Reprod. 2003 Dec;69(6):2045–52.
32. Hu Y, Cortvrindt R, Smitz J. Effects of aromatase inhibition on in vitro follicle and oocyte development analyzed by early preantral mouse follicle culture. Mol Reprod Dev. 2002 Apr;61(4):549–59.
33. Quinn P, Warnes GM, Kerin JF, Kirby C. Culture factors affecting the success rate of in vitro fertilization and embryo transfer. Ann N Y Acad Sci. 1985;442:195–204.
34. Ackerman SB, Taylor SP, Swanson RJ, Laurell LH. Mouse embryo culture for screening in human IVF. Arch Androl. 1984;12 Suppl:129–36.
35. Scott L, Smith S. Mouse in vitro fertilization, embryo development and viability, and human sperm motility in substances used for human sperm preparation for assisted reproduction. Fertil Steril. 1997 Feb;67(2):372–81.
36. McDowell JS, Swanson RJ, Maloney M, Veeck L. Mouse embryo quality control for toxicity determination in the Norfolk in vitro fertilization program. J Vitro Fertil Embryo Transf IVF. 1988 Jun;5(3):144–8.
37. Tucker KE, Hurst BS, Guadagnoli S, Dymecki C, Mendelsberg B, Awoniyi CA, et al. Evaluation of synthetic serum substitute versus serum as protein supplementation for mouse and human embryo culture. J Assist Reprod Genet. 1996 Jan;13(1):32–7.
38. Van Merris V, Van Wemmel K, Cortvrindt R. In vitro effects of dexamethasone on mouse ovarian function and pre-implantation embryo development. Reprod Toxicol Elmsford N. 2007 Jan;23(1):32–41.
39. Davidson A, Vermesh M, Lobo RA, Paulson RJ. Mouse embryo culture as quality control for human in vitro fertilization: the one-cell versus the two-cell model. Fertil Steril. 1988 Mar;49(3):516–21.
40. Gorrill MJ, Rinehart JS, Tamhane AC, Gerrity M. Comparison of the hamster sperm motility assay to the mouse one-cell and two-cell embryo bioassays as quality control tests for in vitro fertilization. Fertil Steril. 1991 Feb;55(2):345–54.
41. Fukuda A, Noda Y, Tsukui S, Matsumoto H, Yano J, Mori T. Influence of water quality on in vitro fertilization and embryo development for the mouse. J Vitro Fertil Embryo Transf IVF. 1987 Feb;4(1):40–5.
42. George MA, Braude PR, Johnson MH, Sweetnam DG. Quality control in the IVF laboratory: in-vitro and in-vivo development of mouse embryos is unaffected by the quality of water used in culture media. Hum Reprod Oxf Engl. 1989 Oct;4(7):826–31.
43. Esterhuizen AD, Bosman E, Botes AD, Groenewald OA, Giesteira MV, Labuschagne GP, et al. A comparative study on the diagnostic sensitivity of rodent sperm and embryos in the detection of endotoxin in Earle’s balanced salt solution. J Assist Reprod Genet. 1994 Jan;11(1):38–42.
44. Randall GW, Gantt PA. Preimplantation murine embryos are more resistant than human embryos to bacterial endotoxins. J Vitro Fertil Embryo Transf IVF. 1990 Oct;7(5):280–2.
45. Flood LP, Shirley B. Reduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. Mol Reprod Dev. 1991 Nov;30(3):226–31.
46. Gardner DK, Sakkas D. Assessment of embryo viability: the ability to select a single embryo for transfer--a review. Placenta. 2003 Oct;24 Suppl B:S5-12.
47. Chin HJ, Wang CK. Utero-tubal transfer of mouse embryos. Genes N Y N 2000. 2001 Jun;30(2):77–81.

48. Sarvari A, Naderi MM, Sadeghi MR, Akhondi MM. A Technique for Facile and Precise Transfer of Mouse Embryos. Avicenna J Med Biotechnol. 2013;5(1):62–5.
49. de Jong E, Louisse J, Verwei M, Blaauboer BJ, van de Sandt JJM, Woutersen RA, et al. Relative developmental toxicity of glycol ether alkoxy acid metabolites in the embryonic stem cell test as compared with the in vivo potency of their parent compounds. Toxicol Sci Off J Soc Toxicol. 2009 Jul;110(1):117–24.
50. de Jong E, van Beek L, Piersma AH. Osteoblast differentiation of murine embryonic stem cells as a model to study the embryotoxic effect of compounds. Toxicol In Vitro. 2012 Sep;26(6):970–8.
51. de Jong E, van Beek L, Piersma AH. Comparison of osteoblast and cardiomyocyte differentiation in the embryonic stem cell test for predicting embryotoxicity in vivo. Reprod Toxicol. 2014 Sep;48:62–71.
52. Chen X, Hansen DK, Merry G, DeJarnette C, Nolen G, Sloper D, et al. Developing osteoblasts as an endpoint for the mouse embryonic stem cell test. Reprod Toxicol. 2015 Jun;53:131–40.
53. Bertheussen K, Holst N, Forsdahl F, Høie KE. A new cell culture assay for quality control in IVF. Hum Reprod Oxf Engl. 1989 Jul;4(5):531–5.
54. Young RJ, Bodt BA, Iturralde TG, Starke WC. Automated analysis of rabbit sperm motility and the effect of chemicals on sperm motion parameters. Mol Reprod Dev. 1992 Nov;33(3):347–56.
55. Stewart-Savage J, Bavister BD. Deterioration of stored culture media as monitored by a sperm motility bioassay. J Vitro Fertil Embryo Transf IVF. 1988 Apr;5(2):76–80.
56. Bavister BD, Andrews JC. A rapid sperm motility bioassay procedure for quality-control testing of water and culture media. J Vitro Fertil Embryo Transf IVF. 1988 Apr;5(2):67–75.
57. Reed ML, Petters RM. An evaluation of hamster, rat, and mouse sperm-cell motility in media formulated with water of different qualities. J Vitro Fertil Embryo Transf IVF. 1991 Feb;8(1):41–7.
58. Chan PJ, Calinisan JH, Corselli JU, Patton WC, King A. Updating quality control assays in the assisted reproductive technologies laboratory with a cryopreserved hamster oocyte DNA cytogenotoxic assay. J Assist Reprod Genet. 2001 Mar;18(3):129–34.
59. Ray BD, McDermott A, Wardle PG, Corrigan E, Mitchell JD, McLaughlin EA, et al. In vitro fertilization: fertilization failure due to toxic catheters. J Vitro Fertil Embryo Transf IVF. 1987 Feb;4(1):58–61.
60. Kemp RB, Beck NF, Meredith RW, Gamble SH. Bull sperm as a potential model system for cytotoxicity testing in vitro. Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA. 1990;4(1):47–50.
61. Hinsch E, Ponce AA, Hägele W, Hedrich F, Müller-Schlösser F, Schill WB, et al. A new combined in-vitro test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. Hum Reprod Oxf Engl. 1997 Aug;12(8):1673–81.
62. Hong CY, Chaput de Saintonge DM, Turner P. A simple method to measure drug effects on human sperm motility. Br J Clin Pharmacol. 1981 Apr;11(4):385–7.
63. Hossain A, Aryal S, Osuampke C, Phelps J. Human sperm bioassay for reprotoxicity testing in embryo culture media: some practical considerations in reducing the assay time. Adv Urol. 2010;2010:136898.

64. Stovall DW, Guzick DS, Berga SL, Krasnow JS, Zeleznik AJ. Sperm recovery and survival: two tests that predict in vitro fertilization outcome. Fertil Steril. 1994 Dec;62(6):1244–9.
65. Alvarez JG, Minaretzis D, Barrett CB, Mortola JF, Thompson IE. The sperm stress test: a novel test that predicts pregnancy in assisted reproductive technologies. Fertil Steril. 1996 Feb;65(2):400–5.
66. Franco JG, Mauri AL, Petersen CG, Baruffi RL, Campos MS, Oliveira JB. Efficacy of the sperm survival test for the prediction of oocyte fertilization in culture. Hum Reprod Oxf Engl. 1993 Jun;8(6):916–8.
67. Claassens OE, Wehr JB, Harrison KL. Optimizing sensitivity of the human sperm motility assay for embryo toxicity testing. Hum Reprod Oxf Engl. 2000 Jul;15(7):1586–91.
68. Lierman S, De Sutter P, Dhont M, Van der Elst J. Double-quality control reveals high-level toxicity in gloves used for operator protection in assisted reproductive technology. Fertil Steril. 2007 Oct;88(4 Suppl):1266–72.
69. Makler A, Fisher M, Murillo O, Laufer N, DeCherney A, Naftolin F. Factors affecting sperm motility. IX. survival of spermatozoa in various biological media and under different gaseous compositions. Fertil Steril. 1984 Mar;41(3):428–32.
70. Parinaud J, Milhet P, Vieitez G, Richoilley G. Human sperm capacitation and in-vitro fertilization in a chemically defined and protein-free medium SMART1. Hum Reprod Oxf Engl. 1998 Sep;13(9):2579–82.
71. Fishel SB, Walters DE, Yodyinguad V, Edwards RG. Time-dependent motility changes of human spermatozoa after preparation for in vitro fertilization. J Vitro Fertil Embryo Transf IVF. 1985 Dec;2(4):233–6.
72. Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Abbas AM, Elattar I. The life span of sperm motility and pattern in cumulus coculture. Fertil Steril. 1995 Mar;63(3):660–2.
73. Fishel S, Jackson P, Webster J, Faratian B. Endotoxins in culture medium for human in vitro fertilization. Fertil Steril. 1988 Jan;49(1):108–11.
74. Snyman E, Van der Merwe JV. Endotoxin-polluted medium in a human in vitro fertilization program. Fertil Steril. 1986 Aug;46(2):273–6.
75. Nagata Y, Shirakawa K. Setting standards for the levels of endotoxin in the embryo culture media of human in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril. 1996 Mar;65(3):614–9.
76. de Ziegler D, Cedars MI, Hamilton F, Moreno T, Meldrum DR. Factors influencing maintenance of sperm motility during in vitro processing. Fertil Steril. 1987 Nov;48(5):816–20.
77. Morimoto Y, Hayashi E, Ohno T, Kawata A, Horikoshi Y, Kanzaki H. Quality control of human IVF/ICSI program using endotoxin measurement and sperm survival test. Hum Cell. 1997 Dec;10(4):271–6.
78. Le choix des désinfectants [Internet]. SF2H. [cited 2017 Jul 9]. Available from: https://sf2h.net/publications/le-choix-des-desinfectants
79. Siracusa A, De Blay F, Folletti I, Moscato G, Olivieri M, Quirce S, et al. Asthma and exposure to cleaning products - a European Academy of Allergy and Clinical Immunology task force consensus statement. Allergy. 2013 Dec;68(12):1532–45.
80. Singer BC, Destaillats H, Hodgson AT, Nazaroff WW. Cleaning products and air

fresheners: emissions and resulting concentrations of glycol ethers and terpenoids. Indoor Air. 2006 Jun;16(3):179–91.
81. Niu X, Ho SSH, Ho KF, Huang Y, Cao J, Shen Z, et al. Indoor secondary organic aerosols formation from ozonolysis of monoterpene: An example of d-limonene with ammonia and potential impacts on pulmonary inflammations. Sci Total Environ. 2017 Feb 1;579:212–20.
82. Cicolella A. [Volatile Organic Compounds (VOC): definition, classification and properties]. Rev Mal Respir. 2008 Feb;25(2):155–63.
83. Directive 1999/13/CE du Conseil relative à la réduction des émissions de composés organiques volatils dues à l'utilisation de solvants organiques dans certaines activités et installations.
84. Directive 2002/3/CE du Parlement européen et du Conseil du 12 février 2002 relative à l'ozone dans l'air ambiant.
85. Les composés organiques volatils (COV) - Définition, sources d'émission et im... [Internet]. ADEME. [cited 2017 Apr 3]. Available from: http://www.ademe.fr/entreprises-monde-agricole/reduire-impacts/reduire-emissions-polluants/dossier/composes-organiques-volatils-cov/definition-sources-demission-impacts
86. Cohen J, Gilligan A, Esposito W, Schimmel T, Dale B. Ambient air and its potential effects on conception in vitro. Hum Reprod Oxf Engl. 1997 Aug;12(8):1742–9.
87. Khoudja RY, Xu Y, Li T, Zhou C. Better IVF outcomes following improvements in laboratory air quality. J Assist Reprod Genet. 2013 Jan;30(1):69–76.
88. Brown SK. Chamber assessment of formaldehyde and VOC emissions from wood-based panels. Indoor Air. 1999 Sep;9(3):209–15.
89. Chang JC, Fortmann R, Roache N, Lao HC. Evaluation of low-VOC latex paints. Indoor Air. 1999 Dec;9(4):253–8.
90. Wallace LA. Comparison of risks from outdoor and indoor exposure to toxic chemicals. Environ Health Perspect. 1991 Nov;95:7–13.
91. Mitchell CS, Zhang JJ, Sigsgaard T, Jantunen M, Lioy PJ, Samson R, et al. Current state of the science: health effects and indoor environmental quality. Environ Health Perspect. 2007 Jun;115(6):958–64.
92. Gonzalez-Flesca N, Cicolella A, Bates M, Bastin E. Pilot study of personal, indoor and outdoor exposure to benzene, formaldehyde and acetaldehyde. Environ Sci Pollut Res Int. 1999;6(2):95–102.
93. Wainman T, Zhang J, Weschler CJ, Lioy PJ. Ozone and limonene in indoor air: a source of submicron particle exposure. Environ Health Perspect. 2000 Dec;108(12):1139–45.
94. Fan Z, Lioy P, Weschler C, Fiedler N, Kipen H, Zhang J. Ozone-initiated reactions with mixtures of volatile organic compounds under simulated indoor conditions. Environ Sci Technol. 2003 May 1;37(9):1811–21.
95. Weschler CJ. Ozone's impact on public health: contributions from indoor exposures to ozone and products of ozone-initiated chemistry. Environ Health Perspect. 2006 Oct;114(10):1489–96.
96. Sunil VR, Laumbach RJ, Patel KJ, Turpin BJ, Lim H-J, Kipen HM, et al. Pulmonary effects of inhaled limonene ozone reaction products in elderly rats. Toxicol Appl Pharmacol. 2007 Jul 15;222(2):211–20.

97. Wolkoff P, Nielsen GD. Effects by inhalation of abundant fragrances in indoor air - An overview. Environ Int. 2017 Apr;101:96–107.
98. Pope CA, Dockery DW, Spengler JD, Raizenne ME. Respiratory health and PM10 pollution. A daily time series analysis. Am Rev Respir Dis. 1991 Sep;144(3 Pt 1):668–74.
99. Peters JM, Avol E, Navidi W, London SJ, Gauderman WJ, Lurmann F, et al. A study of twelve Southern California communities with differing levels and types of air pollution. I. Prevalence of respiratory morbidity. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Mar;159(3):760–7.
100. Andersson K, Bakke JV, Bjørseth O, Bornehag C-G, Clausen G, Hongslo JK, et al. TVOC and Health in Non-industrial Indoor Environments. Indoor Air. 1997 Jun 1;7(2):78–91.
101. Barker DJ. The fetal and infant origins of adult disease. BMJ. 1990 Nov 17;301(6761):1111.
102. Ritz B, Wilhelm M. Ambient air pollution and adverse birth outcomes: methodologic issues in an emerging field. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008 Feb;102(2):182–90.
103. Dadvand P, Rankin J, Rushton S, Pless-Mulloli T. Ambient air pollution and congenital heart disease: a register-based study. Environ Res. 2011 Apr;111(3):435–41.
104. Srám RJ, Binková B, Rössner P, Rubes J, Topinka J, Dejmek J. Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. Mutat Res. 1999 Jul 16;428(1–2):203–15.
105. Arnould JP, Verhoest P, Bach V, Libert JP, Belegaud J. Detection of benzo[a]pyrene-DNA adducts in human placenta and umbilical cord blood. Hum Exp Toxicol. 1997 Dec;16(12):716–21.
106. Perera FP, Jedrychowski W, Rauh V, Whyatt RM. Molecular epidemiologic research on the effects of environmental pollutants on the fetus. Environ Health Perspect. 1999 Jun;107 Suppl 3:451–60.
107. Dejmek J, Solanský I, Benes I, Lenícek J, Srám RJ. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. Environ Health Perspect. 2000 Dec;108(12):1159–64.
108. Srám RJ, Binková B, Dejmek J, Bobak M. Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature. Environ Health Perspect. 2005 Apr;113(4):375–82.
109. Oberdörster G, Utell MJ. Ultrafine particles in the urban air: to the respiratory tract--and beyond? Environ Health Perspect. 2002 Aug;110(8):A440-441.
110. Sioutas C, Delfino RJ, Singh M. Exposure assessment for atmospheric ultrafine particles (UFPs) and implications in epidemiologic research. Environ Health Perspect. 2005 Aug;113(8):947–55.
111. Cho AK, Sioutas C, Miguel AH, Kumagai Y, Schmitz DA, Singh M, et al. Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles Basin. Environ Res. 2005 Sep;99(1):40–7.
112. Souza M do CB, Mancebo ACA, da Rocha C de A, Henriques CA, Souza MM, Cardoso FFO. Evaluation of two incubation environments--ISO class 8 versus ISO class 5--on intracytoplasmic sperm injection cycle outcome. Fertil Steril. 2009 May;91(5):1780–4.
113. Hall J, Gilligan A, Schimmel T, Cecchi M, Cohen J. The origin, effects and control of air pollution in laboratories used for human embryo culture. Hum Reprod Oxf Engl. 1998 Dec;13 Suppl 4:146–55.
114. Worrilow KC, Huynh HT, Peters AJ. The Innovative Marriage Between Cleanroom and

Assisted Reproductive Technologies (ART)—The Design, Construction and National Environmental Balancing Bureau (NEBB) Certification of a Prototype Class 100/Class 10 IVF Laboratory Cleanroom. Fertil Steril. 2000 Sep 1;74(3):S103.
115. Martínez-Hurtado JL, Davidson C a. B, Blyth J, Lowe CR. Holographic detection of hydrocarbon gases and other volatile organic compounds. Langmuir ACS J Surf Colloids. 2010 Oct 5;26(19):15694–9.
116. Boone WR, Johnson JE, Locke AJ, Crane MM, Price TM. Control of air quality in an assisted reproductive technology laboratory. Fertil Steril. 1999 Jan;71(1):150–4.
117. Gilligan A, Schimmel T, Esposito B, Cohen J. O-105 Release of volatile organic compounds such as styrene by sterile petri dishes and flasks used for in-vitro fertilization. Fertil Steril. 1997 Jan 1;68:S52–3.
118. DeHaan RL. Toxicity of tissue culture media exposed to polyvinyl chloride plastic. Nature New Biol. 1971 May 19;231(20):85–6.
119. Munch EM, Sparks AE, Duran HE, Van Voorhis BJ. Lack of carbon air filtration impacts early embryo development. J Assist Reprod Genet. 2015 Jul;32(7):1009–17.
120. Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, et al. The embryo and its future. Biol Reprod. 2004 Oct;71(4):1046–54.
121. Little SA, Mirkes PE. Relationship of DNA damage and embryotoxicity induced by 4-hydroperoxydechlorocyclophosphamide in postimplantation rat embryos. Teratology. 1990 Feb;41(2):223–31.
122. Maluf M, Perin PM, Foltran Januário DAN, Nascimento Saldiva PH. In vitro fertilization, embryo development, and cell lineage segregation after pre- and/or postnatal exposure of female mice to ambient fine particulate matter. Fertil Steril. 2009 Nov;92(5):1725–35.
123. Perin PM, Maluf M, Czeresnia CE, Nicolosi Foltran Januário DA, Nascimento Saldiva PH. Effects of exposure to high levels of particulate air pollution during the follicular phase of the conception cycle on pregnancy outcome in couples undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril. 2010 Jan;93(1):301–3.
124. Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, et al. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. Hum Reprod Oxf Engl. 2005 Oct;20(10):2776–83.
125. Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, Zudová Z, Rubes J, Evenson DP, et al. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. Environ Health Perspect. 2000 Sep;108(9):887–94.
126. Topinka J, Binková B, Mracková G, Stávková Z, Peterka V, Benes I, et al. Influence of GSTM1 and NAT2 genotypes on placental DNA adducts in an environmentally exposed population. Environ Mol Mutagen. 1997;30(2):184–95.
127. Binková B, Lewtas J, Misková I, Lenícek J, Srám R. DNA adducts and personal air monitoring of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in an environmentally exposed population. Carcinogenesis. 1995 May;16(5):1037–46.
128. Morbeck DE. Air quality in the assisted reproduction laboratory: a mini-review. J Assist Reprod Genet. 2015 Jul;32(7):1019–24.
129. Dickey RP, Wortham JWE, Potts A, Welch A. Effect of IVF laboratory air quality on pregnancy success. Fertil Steril. 2010 Sep 1;94(4):S151.

130. Forman M, Polanski V, Horvath P, Gilligan A, Rieger D. Reductions in volatile organic compounds, aldehydes, and particulate air contaminants in an IVF laboratory by centralized and stand-alone air filtration systems. Fertil Steril. 2004 Sep 1;82:S324.
131. Esteves SC, Gomes AP, Verza S. Control of air pollution in assisted reproductive technology laboratory and adjacent areas improves embryo formation, cleavage and pregnancy rates and decreases abortion rate: Comparison between a class 100 (ISO 5) and a class 1.000 (ISO 6) cleanroom for micromanipulation and embryo culture. Fertil Steril. 2004 Sep 1;82:S259–60.
132. Legro RS, Sauer MV, Mottla GL, Richter KS, Li X, Dodson WC, et al. Effect of air quality on assisted human reproduction. Hum Reprod Oxf Engl. 2010 May;25(5):1317–24.
133. Esteves SC, Junior SV, Gomes AP. Comparison between International Standard Organization (ISO) type 5 and type 6 cleanrooms combined with volatile organic compounds filtration system for micromanipulation and embryo culture in severe male factor infertility. Fertil Steril. 2006 Sep 1;86(3):S353–4.
134. Worrilow KC, Huynh HT, Gwozdziewicz JB, Schillings WA, Peters AJ. A retrospective analysis: the examination of a potential relationship between particulate (P) and volatile organic compound (VOC) levels in a class 100 IVF laboratory cleanroom (CR) and specific parameters of embryogenesis and rates of implantation (IR). Fertil Steril. 2001 Sep 1;76(3):S15–6.
135. Esteves SC, Bento FC. Implementation of cleanroom technology in reproductive laboratories: the question is not why but how. Reprod Biomed Online. 2016 Jan;32(1):9–11.
136. Heitmann RJ, Hill MJ, James AN, Schimmel T, Segars JH, Csokmay JM, et al. Live births achieved via IVF are increased by improvements in air quality and laboratory environment. Reprod Biomed Online. 2015 Sep;31(3):364–71.
137. Jindal SK, Polotsky AJ, Buyuk ER, Lieman HJ, Gilligan A. Improved pregnancy rates following introduction of engineering controls of lab air quality. Fertil Steril. 2008 Sep 1;90:S403.
138. Forman M, Sparks AET, Degelos S, Koulianos G, Worrilow KC. Statistically significant improvements in clinical outcomes using engineered molecular media and genomically modeled ultraviolet light for comprehensive control of ambient air (AA) quality. Fertil Steril. 2014 Sep 1;102(3):e91.
139. Worrilow KC, Huynh HT, Bower JB, Schillings WJ. Dissection of the high velocity air control (HVAC) system serving the in vitro fertilization (IVF) laboratory: the impact of ultraviolet-c band (UVC) irradiation on clinical pregnancy rates (CPR). Fertil Steril. 2007 Sep 1;88:S89.
140. Battaglia DE, Khabani A, Rainer C, Moore DE. Prospective Randomized Trial of Incubator CODA Filtration Units Revealed No Effect on Outcome Parameters for IVF. Fertil Steril. 2001 Apr 1;75(4):S6.
141. McLellan ST, Panagoulopoulos C, Dickinson KA, Wright DL, Toth TL, Lanzendorf SE. Effect of incubator air filtration system on IVF outcomes. Fertil Steril. 2001 Sep 1;76(3):S103.
142. Sene IS, Carvalho BF, Freitas T a. F, Pádua LEM, Sousa GNS, Bona LN. Comparing HEPA versus HEPA-VOC filtration system: influence on embryo quality and clinical outcomes of in vitro fertilization. Fertil Steril. 2009 Sep 1;92(3):S234.
143. Merton JS, Vermeulen ZL, Otter T, Mullaart E, de Ruigh L, Hasler JF. Carbon-activated

gas filtration during in vitro culture increased pregnancy rate following transfer of in vitro-produced bovine embryos. Theriogenology. 2007 Apr 15;67(7):1233–8.
144. Van Voorhis BJ, Thomas M, Surrey ES, Sparks A. What do consistently high-performing in vitro fertilization programs in the U.S. do? Fertil Steril. 2010 Sep;94(4):1346–9.
145. von Wyl S, Bersinger NA. Air quality in the IVF laboratory: results and survey. J Assist Reprod Genet. 2004 Aug;21(8):283–4.
146. Mortimer D. A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells Directive (2004) on laboratory practices in assisted conception. Reprod Biomed Online. 2005 Aug;11(2):162–76.
147. Saunders D, Pope A. Response to article -- "A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cell Directive (2004) on laboratory practices in assisted conception" by David Mortimer. Reprod Biomed Online. 2005 Oct;11(4):407–8.
148. Bhargava PM. On the critical assessment of the impact of the recent European Union Tissues and Cells Directive. Reprod Biomed Online. 2005 Aug;11(2):161.
149. Hartshorne GM. Challenges of the EU "tissues and cells" directive. Reprod Biomed Online. 2005 Oct;11(4):404–7.
150. Worrilow KC, Huynh HT, Bower JB, Schillings W, Peters AJ. A retrospective analysis: seasonal decline in implantation rates (IR) and its correlation with increased levels of volatile organic compounds (VOC). Fertil Steril. 2002 Sep 1;78:S39.
151. Chiang Y-C, Chiang P-C, Huang C-P. Effects of pore structure and temperature on VOC adsorption on activated carbon. Carbon. 2001 Apr;39(4):523–34.
152. Hodgson AT, Destaillats H, Sullivan DP, Fisk WJ. Performance of ultraviolet photocatalytic oxidation for indoor air cleaning applications. Indoor Air. 2007 Aug;17(4):305–16.
153. Destaillats H, Sleiman M, Sullivan DP, Jacquiod C, Sablayrolles J, Molins L. Key parameters influencing the performance of photocatalytic oxidation (PCO) air purification under realistic indoor conditions. Appl Catal B Environ. 2012 Nov 30;128:159–70.
154. Hay SO, Obee TN, Thibaud-Erkey C. The deactivation of photocatalytic based air purifiers by ambient siloxanes. Appl Catal B Environ. 2010 Sep 9;99(3–4):435–41.
155. Wiemer KE, Garrisi J, Steuerwald N, Alikani M, Reing AM, Ferrara TA, et al. Beneficial aspects of co-culture with assisted hatching when applied to multiple-failure in-vitro fertilization patients. Hum Reprod Oxf Engl. 1996 Nov;11(11):2429–33.
156. Chang T "Arthur." Human sperm survival bioassay to examine toxicity of a new clinical laboratory equipment disinfectant. Poster scientifique presented at; School of medicine - University of Texas Health Science Center - Department of obstetrics and gynecology.
157. Chang T-C, Eddy CA, Jacoby ES, Pena MO de la, Brzyski RG, Schenken RS. Human sperm survival bioassay to examine toxicity of a new laboratory equipment disinfectant. Fertil Steril. 2010 Sep 1;94(4):S229.
158. Karagouga G, Fredrickson JR, Morbeck DE. Interaction of air quality and culture environment: role of protein concentration and oil quality on effects of volatile organic compounds (VOCS) on embryo development. Fertil Steril. 2014 Sep 1;102(3):e212.
159. Wolff HS, Fredrickson JR, Walker DL, Morbeck DE. Advances in quality control: mouse embryo morphokinetics are sensitive markers of in vitro stress. Hum Reprod Oxf Engl. 2013 Jul;28(7):1776–82.

ANNEXES

Annexe I : Publications étudiant l'impact de la qualité de l'air au laboratoire d'AMP
Annexe II : Synthèse du mode opératoire de l'étude BIONETTOX-FIV
Annexe III : Exemple de feuille de travail (ici celle de l'expérimentation n°3)
Annexe IV : Exemple de spectre obtenu suite à l'analyse SCAN-COV effectuée au LERES – Rennes (ici spectre du tube témoin blanc)

I Annexe I

AMP : Assistance Médicale à la Procréation ; COV : Composés Organiques Volatils ; HEPA : High Efficiency Particulate Air (filtration) ; HVAC : High Velocity Air Control ; $KMn0_4$: Permanganate de potassium (filtres) ; TB : Taux de Blastulation ; TC : Taux de Clivage ; TF : Taux de Fécondation ; TG : Taux de Grossesse ; TI : Taux d'Implantation ; TN : Taux de Naissances ; TFCS : Taux de Fausses Couches Spontanées ; UVPCO : UltraViolet PhotoCatalytic Oxidation

Tableau 17 : Publications étudiant l'impact de la qualité de l'air au laboratoire d'AMP

Auteurs	Type d'étude	Période	Systèmes de filtration de l'air	Procédés chimiques	Résultats	Limites
ETUDES MONTRANT UN INTERET DE LA MISE EN PLACE D'UNE FILTRATION DES COV EN AMP						
Munch *et al.* (119)	Rétrospective comparative	2010 – 2012	HEPA	Mise en place d'une filtration avec charbon actif	TF, TC, TB ↓ si pas de charbon actif	- Pas de mesure réelle des COV - Plus d'embryons transférés pendant la période sans charbon actif - TG, TI inchangés
Boone *et al.* (116)	Rétrospective comparative	1993 – 1997	Construction laboratoire ISO Classe 5	Filtres avec charbon actif	TF, TG ↑ avec norme ISO Classe 5	- Changement en parallèle de technique de transfert embryonnaire - Pas de mesure réelle des COV
Jindal *et al.* (137)	Rétrospective comparative	2006 – 2007	HEPA	- $KMnO_4$ - Charbon actif	TG ↑ avec systèmes filtrants (46,8 vs 32,9 ; p=0,005)	Pas de mesure réelle des COV

Auteurs	Type d'étude	Période	Systèmes de filtration de l'air	Procédés chimiques	Résultats	Limites
Forman *et al.* (138)	Rétrospective comparative	2012 – 2013	_	- Charbon actif - UVPCO	TB, TI, TG, TN ↑	Pas de mesure réelle des COV
Worrilow *et al.* (139)	Rétrospective comparative	6 ans et demi	HVAC	Irradiation UV-C	TG ↑	- Pas de mesure réelle des COV - Impact microbiologique prédominant
Khoudja *et al.* (87)	Prospective expérimentale comparative (mesure taux COV)	2011	HEPA	Charbon actif	- ↓ Taux COV en dehors, à l'intérieur du laboratoire et dans les étuves - TF, TC, TB, TI, TG ↑	Certains COV ne diminuent pas malgré l'application des systèmes filtrants (ex : propylène et propane)
Forman *et al.* (130)	Prospective expérimentale comparative (mesure taux COV)	_	HEPA	- Charbon actif - $KMnO_4$ - Tour CODA®	↓ Taux COV avec tour CODA®	Pas de lien fait avec les outils d'évaluation classiques en AMP (TF, TC, TG etc.)
Esteves *et al.* (131,133)	Rétrospective comparative	2000 – 2003	ISO classe 6 (HEPA + Tour CODA®) Versus ISO classe 5 (HEPA + Filtres charbon actif + Pression positive +		Avec ISO classe 5 : qualité embryons J3, TC et TG ↑, TFCS ↓	Pas de mesure réelle des COV

Auteurs	Type d'étude	Période	Systèmes de filtration de l'air	Procédés chimiques	Résultats	Limites
			Unités de filtration intra-incubateurs + Filtres charbon actif entre bonbonnes de gaz et incubateurs)			
Esteves et Bento (24)	Rétrospective comparative	1999 – 2010	ISO classe 5	Filtres charbon actif	TF, TB et TG ↑ avec ISO classe 5	Pas de mesure réelle des COV
Worrilow *et al.* (134)	Rétrospective	_	ISO classe 5	_	TI lié au taux de COV	Mesure des COV non exhaustive
Heitmann *et al.* (136)	Rétrospective	_	_	CODA®	TB (et qualité des blastocystes), TI et TN ↑	Pas de mesure réelle des COV
Dickey *et al.* (129)	Rétrospective comparative	Environ 4 ans-	- Pression positive - HEPA	Filtres charbon actif	TI et TG ↑	- Pas de mesure réelle des COV - Changement des pratiques de transfert embryonnaire
ETUDES METTANT EN CAUSE L'INTERET D'UNE FILTRATION DES COV EN AMP						
Souza *et al.* (112)	Rétrospective comparative randomisée	2002 – 2005	Dans les incubateurs : ISO classe 8 Versus ISO classe 5 (HEPA)		TF et TC : Pas de différence significative	- Pas de mesure réelle des COV - Etude de l'air des étuves uniquement
Battaglia *et al.* (140)	Prospective comparative randomisée	2000	_	Filtres CODA® pour incubateurs	Qualité et nombre d'embryons transférés et TG : Pas de différence significative	- Pas de mesure réelle des COV - Etude de l'air des étuves uniquement

Auteurs	Type d'étude	Période	Systèmes de filtration de l'air	Procédés chimiques	Résultats	Limites
McLellan *et al.* (141)	Prospective comparative randomisée	–	–	- Filtres CODA® pour incubateurs - Filtres pour bonbonnes de gaz	TI, TG et TN : Pas de différence significative	- Pas de mesure réelle des COV - Etude de l'air des étuves uniquement
Sene *et al.* (142)	Prospective comparative randomisée	2008 – 2009	HEPA	Filtres charbon actif incubateurs suivant le groupe de l'étude	↑ Nombre d'embryons J3 dans groupe « filtres » MAIS TB, TI, TG TFCS et Taux de transfert : Pas de différence significative	Pas de mesure réelle des COV

II Annexe II

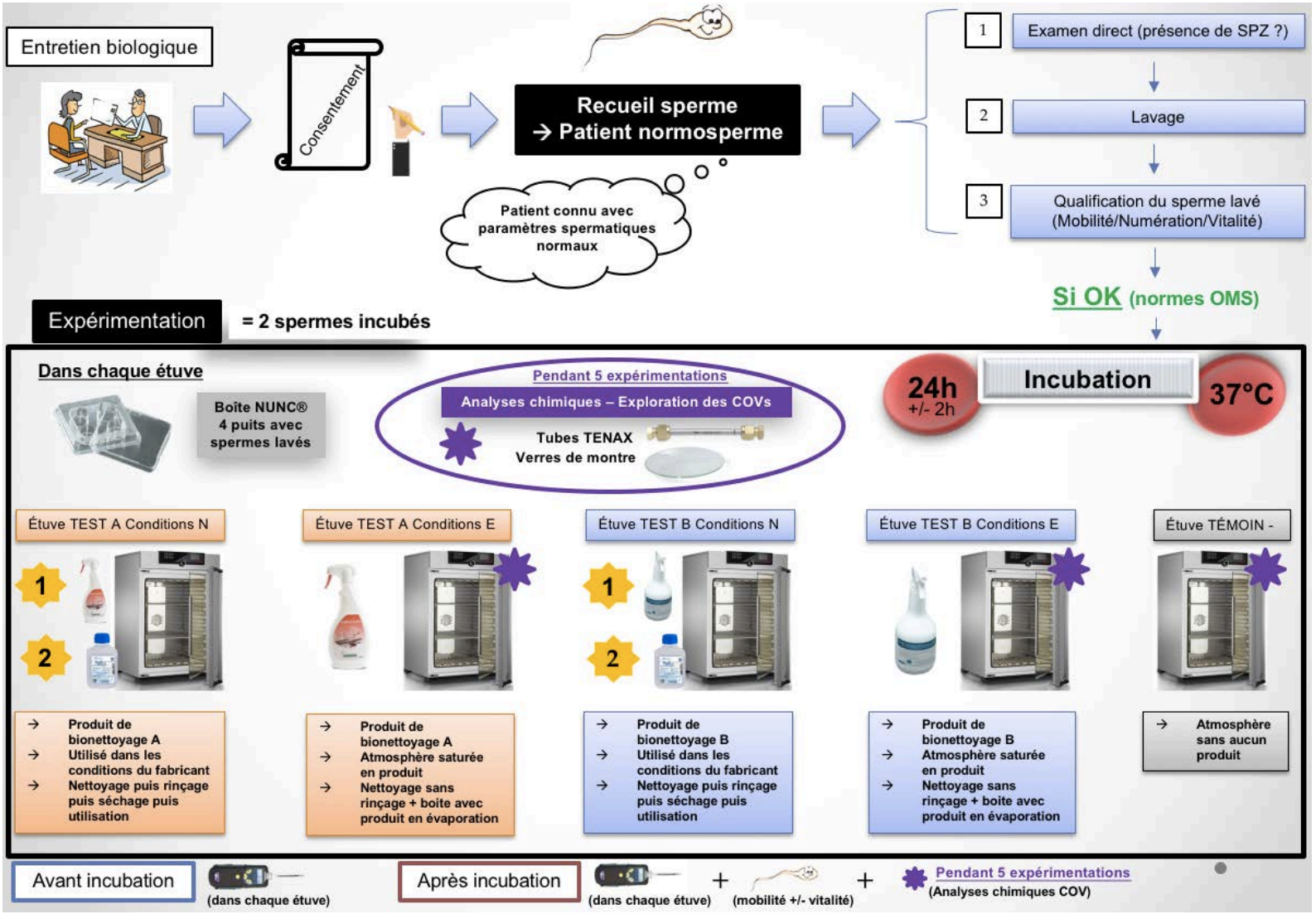


Figure 31 : Synthèse du mode opératoire de l'étude BIONETTOX-FIV

III Annexe III

Tableau 18 : Exemple de feuille de travail – étude BIONETTOX-FIV (ici celle de l'expérimentation n°3)

EXPERIMENTATION N°3

Date d'incubation
15/06/2017

Caractéristiques initiales Sperme n°1				Caractéristiques initiales Sperme n°2			
Mobilité (en %)	a	15	60	Mobilité (en %)	a	80	87
	b	45			b	7	
	c	9			c	5	
	d	31			d	8	
Vitalité (en %)	NA			Vitalité (en %)	NA		
Concentration (en M/mL)	15,1			Concentration (en M/mL)	30		

Remarques :
- Taux COV air ambiant pièce des étuves avant incubation : 205 ppb
- SCAN COV (LERES) pendant cette incubation (3/5)
- Mesure COT (ANIOS) pendant cette incubation (2/5)

		Etuve Témoin négatif			Etuve TEST A Conditions E			Etuve TEST A Conditions N			Etuve TEST B Conditions E			Etuve TEST B Conditions N		
Taux COV avant incubation		308 ppb			320 ppb			306 ppb			310 ppb			303 ppb		
Taux COV après incubation		298 ppb			305 ppb			284 ppb			300 ppb			273 ppb		
APRES INCUBATION	Sperme n°1	Mobilité puit 1 (en%)	a	22	40	Mobilité puit 1 (en%)	a	24	44	Mobilité puit 1 (en%)	a	22	38	Mobilité puit 1 (en%)	a	38	48	Mobilité puit 1 (en%)	a	28	38
			b	18			b	20			b	16			b	10			b	10	
			c	20			c	16			c	22			c	14			c	24	
			d	40			d	40			d	40			d	38			d	38	
		Vitalité puit 1 (en %)	NA			Vitalité puit 1 (en %)	NA			Vitalité puit 1 (en %)	NA			Vitalité puit 1 (en %)	NA			Vitalité puit 1 (en %)	NA		
		Mobilité puit 2 (huile) (en %)	a	36	64	Mobilité puit 2 (huile) (en %)	a	28	56	Mobilité puit 2 (huile) (en %)	a	44	64	Mobilité puit 2 (huile) (en %)	a	62	68	Mobilité puit 2 (huile) (en %)	a	60	70
			b	28			b	28			b	20			b	6			b	10	
			c	4			c	6			c	6			c	14			c	12	
			d	32			d	38			d	30			d	18			d	18	
		Vitalité puit 2 (huile) (en %)	NA			Vitalité puit 2 (huile) (en %)	NA			Vitalité puit 2 (huile) (en %)	NA			Vitalité puit 2 (huile) (en %)	NA			Vitalité puit 2 (huile) (en %)	NA		
	Sperme n°2	Mobilité puit 3 (en %)	a	24	65	Mobilité puit 3 (en %)	a	75	78	Mobilité puit 3 (en %)	a	17	76	Mobilité puit 3 (en %)	a	29	84	Mobilité puit 3 (en %)	a	45	76
			b	41			b	3			b	59			b	55			b	31	
			c	9			c	2			c	4			c	4			c	3	
			d	26			d	20			d	20			d	12			d	21	
		Vitalité puit 3 (en %)	NA			Vitalité puit 3 (en %)	NA			Vitalité puit 3 (en %)	NA			Vitalité puit 3 (en %)	NA			Vitalité puit 3 (en %)	NA		
		Mobilité puit 4 (huile) (en %)	a	63	73	Mobilité puit 4 (huile) (en %)	a	52	75	Mobilité puit 4 (huile) (en %)	a	75	75	Mobilité puit 4 (huile) (en %)	a	63	90	Mobilité puit 4 (huile) (en %)	a	68	79
			b	10			b	23			b	0			b	27			b	11	
			c	6			c	6			c	2			c	0			c	3	
			d	21			d	19			d	23			d	10			d	18	
		Vitalité puit 4 (huile) (en %)	NA			Vitalité puit 4 (huile) (en %)	NA			Vitalité puit 4 (huile) (en %)	NA			Vitalité puit 4 (huile) (en %)	NA			Vitalité puit 4 (huile) (en %)	NA		

IV Annexe IV

```
File       :C:\msdchem\1\DATA\2017\COV ICHAQAI (QAIHOSP)\SCANS\28JUIN201
...         7\28juin09.D
Operator   : GO JH
Instrument :   7890 5975
Acquired   : 28 Jun 2017  19:59     using AcqMethod SCAN COV QAIHOSP.M
Sample Name: Témoin BLANC ouvert le 07/06/2017
Misc Info  : Tube G00284
```

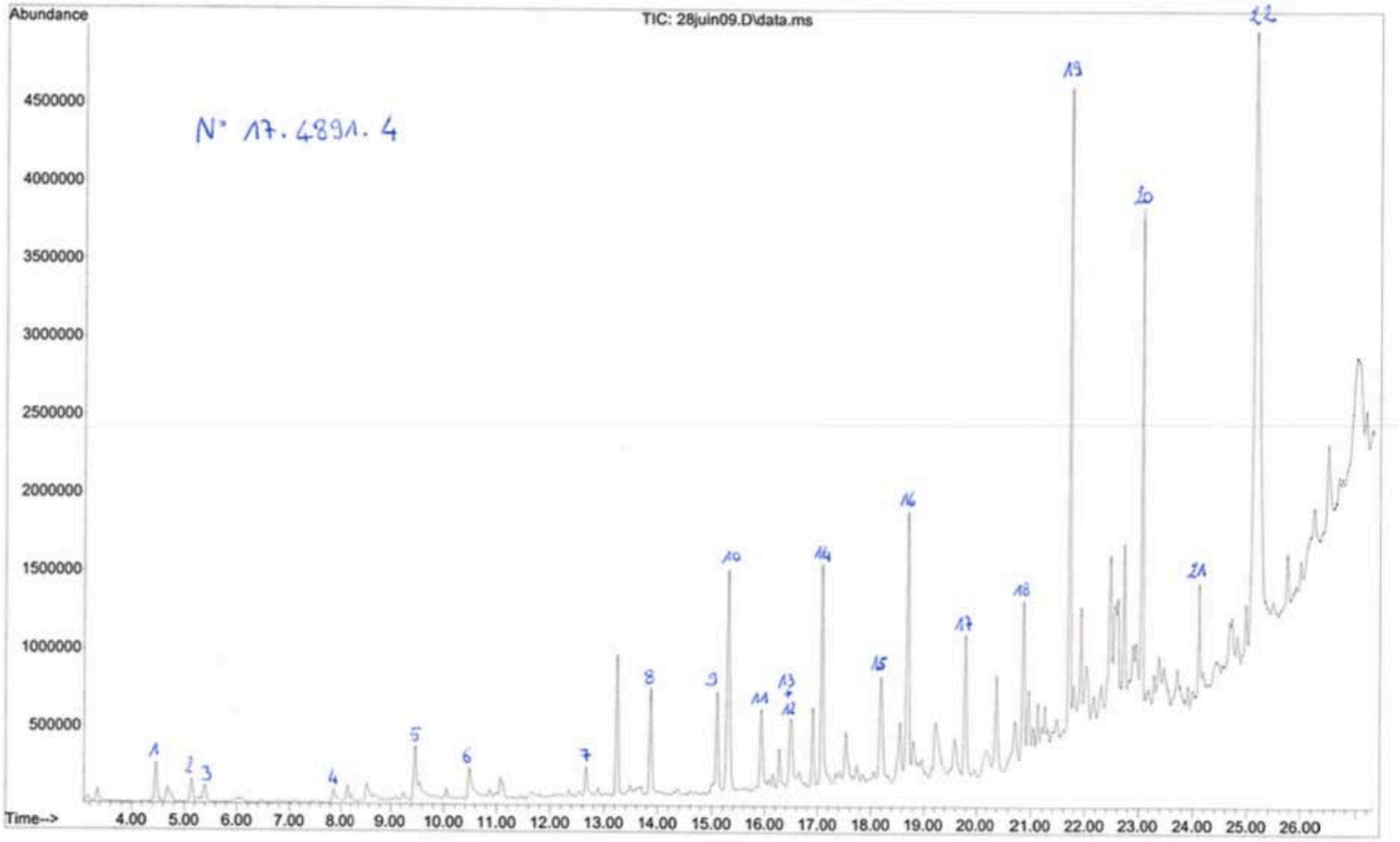


Figure 32 : Spectre du tube témoin blanc obtenu suite à l'analyse SCAN-COV effectuée au LERES – Rennes

FACULTE DE PHARMACIE **UNIVERSITE DE LORRAINE**

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 27/10/2017

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présenté par : Nicolas MONNIN

Sujet : Repro-toxicité : évaluation de l'impact de produits de bionettoyage sur les spermatozoïdes humains, et développement d'un test in vitro, indicateur de repro-toxicité environnementale au laboratoire d'AMP.

Jury :

Président : Mme le Pr BENSOUSSAN Danièle (PU-PH)
Directeur : Mme le Dr KOSCINSKI Isabelle (MCU-PH)
Juges : Mme le Pr FRYDMAN Nelly (PU-PH)
Mr le Pr JOUZEAU Jean-Yves (PU-PH)
Mme le Dr DILIGENT Catherine (PH)
Mr le Dr FLORENTIN Arnaud (PHU)

Vu,

Nancy, le 25/09/2017

Le Président du Jury Directeur de Thèse

Mme D. BENSOUSSAN Mme I. KOSCINSKI

Vu et approuvé,

Nancy, le 29.09.2017

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Lorraine,

Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 12 OCT. 2017

Le Président de l'Université de Lorraine,

Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 10041

TITRE

Repro-toxicité : évaluation de l'impact de produits de bionettoyage sur les spermatozoïdes humains, et développement d'un test *in vitro*, indicateur de repro-toxicité environnementale au laboratoire d'AMP

Thèse soutenue le 27 Octobre 2017

Par Nicolas MONNIN

RÉSUMÉ :

En Assistance Médicale à la Procréation (AMP), de nombreux progrès ont été réalisés permettant d'améliorer les taux d'implantation embryonnaire et de grossesse. Cependant, le taux d'implantation reste limité dans l'espèce humaine. L'optimisation des conditions de culture est indispensable pour améliorer l'efficacité des processus de Fécondation *In Vitro* (FIV). En effet, l'embryon *in vitro* est soumis à des conditions très différentes des conditions *in vivo* et est ainsi impacté par différents facteurs, sources de stress. La réalisation de tests de repro-toxicité pour vérifier l'innocuité des milieux de culture, consommables et autres dispositifs sur les embryons et gamètes humains semble donc essentielle dans la procédure qualité du laboratoire. Un composé peut impacter l'embryon ou les gamètes de manière indirecte par la libération de Composés Organiques Volatils (COV). Or, les produits de bionettoyage utilisés dans les laboratoires peuvent tout à fait être à l'origine d'un dégagement de COV et les lois françaises indiquent même que ces produits bionettoyants doivent être choisis parmi ceux ne présentant pas de toxicité connue sur les gamètes, les tissus germinaux ou les embryons aux doses employées. À ce jour, la littérature ne rapporte aucune étude visant à évaluer et comparer la repro-toxicité de ces produits biodécontaminants utilisés en laboratoire d'AMP. Un état des lieux des pratiques de bionettoyage dans les laboratoires d'AMP de France a tout d'abord été réalisé à l'aide d'un questionnaire envoyé par mailing-liste à l'ensemble des biologistes français des laboratoires d'étude de la fécondation et de la conservation de l'œuf. Notre étude expérimentale intitulée BIONETTOX-FIV a eu pour objectif d'étudier la repro-toxicité des deux produits de bionettoyage les plus utilisés en France et compatibles avec une application dans des étuves de laboratoire, à l'aide d'un mode opératoire original basé sur le test de repro-toxicité « Sperm Survival Test » (SpST). Chaque produit bionettoyant a été testé en utilisant 20 prélèvements spermatiques (n=20 par produit bionettoyant). Pour expliciter un potentiel impact indirect des produits de bionettoyage sur les spermatozoïdes, différentes analyses chimiques ont été menées pendant les incubations pour évaluer et caractériser les COV présents dans les différentes étuves mimant différentes conditions d'incubation (exagérée avec atmosphère saturée en produit ou normale, telle que recommandée par le fournisseur). Les résultats du test SpST ne montrent aucun impact sur la mobilité spermatique des deux produits bionettoyants étudiés et ceci quelle que soit la condition d'incubation. Les analyses chimiques montrent un dégagement de COV spécifique en fonction du produit, mais en faible quantité. Il faut toutefois rester prudent car rien ne prouve ici une innocuité complète d'utilisation de ces produits bionettoyants sur le développement embryonnaire humain et d'autres expérimentations complémentaires doivent être envisagées dans le futur.

MOTS CLÉS : Repro-toxicité, biologie de la reproduction, AMP, bionettoyage, spermatozoïdes, test *in vitro*.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
Dr I. KOSCINSKI	**Laboratoire de Biologie de la Reproduction Maternité CHRU Nancy**	**Expérimentale** **Bibliographique** **Thème**	X ☐ 5

Thèmes **1 – Sciences fondamentales** **2 – Hygiène/Environnement**

3 – Médicament **4 – Alimentation – Nutrition**

5 - Biologie **6 – Pratique professionnelle**