

Université de Montréal

**Rôle de la qualité des tapis de cellules endométriales en co-culture
autologue sur le développement embryonnaire**

Par Alix Neymon Sesques

Faculté de médecine, département gynécologie et obstétrique

Mémoire présenté à la faculté de médecine de l'université de Montréal, en
vue de l'obtention du grade de MSC en sciences bio médicales, option
recherche clinique.

Décembre 2015

©Alix Neymon Sesques 2015



Table des matières

Remerciements	4
Mots clés	5
Key words	6
Résumé.....	7
Abstract.....	10
Liste des sigles et des abréviations.....	12
1. Introduction.....	13
1.1. Rappel de gynécologie	13
Le cycle menstruel.....	13
1.2. La fécondation	15
Le développement ovocytaire et folliculaire	15
La spermatogénèse.....	17
Le développement embryonnaire pré-implantatoire	18
1.3. L'implantation.....	21
Endomètre	21
L'implantation du blastocyste.....	22
1.4. La procreation médicalement assistée (PMA)	23
Généralités	23
FIV	24
Culture embryonnaire in vitro.....	27
2. Introduction générale.....	29
3. Bibliographie.....	32
4. Matériel et méthodes	40
5. Statistique.....	50
5.1. Variables utilisées	50
Objectif primaire	50
Objectifs secondaires	50
5.2. Tests statistiques	51
6. Résultats	52

6.1. Analyse descriptive	52
6.2. Analyse statistique	54
7. Discussion	55
8. Conclusion.....	62
9. Références	64
Curriculum vitae	74
Formation :.....	74
Langue.....	75
Expériences professionnelles :	75
Réalisations personnelles	76
Centres d'intérêt :.....	76

Remerciements

Merci à la clinique ovo, de m'avoir accueillie pendant un an, d'avoir facilité mon année recherche au milieu de mon internat français.

Merci à l'équipe d'ovo R et D de m'avoir appris le métier d'assistante de recherche clinique et de m'avoir fait découvrir ce pays et cette culture extraordinaire.

Merci à dr Kadoch, mon directeur de recherche, qui m'a aidé à comprendre la recherche clinique en m'incluant dans cet essai clinique très intéressant

Merci à Bruno Salle, qui m'a fait découvrir la procréation médicalement assistée et m'a aidé à trouver un poste pendant mon année de recherche à l'étranger.

Mots clés

Fécondation in vitro

Embryon

Endomètre

Co-culture cellulaire autologue

Key words

In Vitro Fertilization

Embryo

Endometrial

Autologous endometrial coculture

Résumé

Introduction :

La fécondation in vitro est de mieux en mieux connue et en amélioration constante, cependant les taux d'implantation et de grossesse sont encore bas (environ 35% par fécondation in vitro). Un des enjeux de l'amélioration de la fécondation in vitro est le développement embryonnaire et l'implantation. Pour cela, la co-culture des embryons sur un tapis de cellules endométriales maternelles autologues peut être utilisée pour améliorer le développement embryonnaire (taux d'embryon se développant jusqu'à J5 : blastocyste) et l'implantation.

L'objectif de l'étude est d'étudier le lien entre la qualité du tapis cellulaire et le développement embryonnaire.

Matériel et méthodes :

Cette étude est une sous analyse de l'essai clinique randomisé en double aveugle OvoGen, comparant le taux de blastulation et de grossesse dans deux groupes randomisés : le groupe étude, dans lequel les embryons se développent sur un tapis cellulaire endométrial maternel et le groupe contrôle, dans lequel les embryons sont cultivés dans du milieu conventionnel.

Nous avons analysé la qualité des tapis cellulaire du groupe étude (confluence des cellules, taux de cellules épithéliales et vitalité des cellules stromales) par rapport au développement embryonnaire et au taux de grossesse.

Résultats :

50 tapis de cellules endométriales maternelles et 291 embryons sur les puits ont été analysés de 2012 à 2015 à la clinique ovo (Montréal, Québec). La qualité des embryons n'était pas changée par la qualité des tapis ($p=0,65$ pour la confluence, $p=0,25$ pour le taux de glande et $p=0,92$ pour la viabilité des cellules). En revanche, le taux de grossesse augmentait quand la confluence diminuait ($p=0,022$) et lorsque la viabilité des cellules stromales augmentait ($p=0,001$). De plus, la qualité des tapis était dépendante de la date de la biopsie : la biopsie faite à J7 après l'ovulation permettait une meilleure qualité de puits (confluence augmentée, $p=0,045$, taux de glande augmenté $p=0,004$ et viabilité stromales augmentée $p=0,001$) que la biopsie faite à J5 post ovulation.

Discussion :

Aucune des nombreuses études sur la co-culture ne porte sur la qualité des tapis cellulaire. Il est intéressant de noter que le taux de grossesse augmente avec la diminution de la confluence et l'augmentation de la viabilité des cellules stromales dans les puits contenant les embryons transférés. Comme il a déjà été démontré, (1) le jour de la biopsie endométriale influe sur la qualité du tapis cellulaire en co-culture et pour que celui-ci soit de bonne qualité, il faut que l'endomètre soit réceptif (après J19 du cycle).

Conclusion :

Nous avons montré que la qualité des tapis cellulaires dépendait du jour de la biopsie d'endomètre et que cette qualité pouvait influencer le bénéfice de la co-culture. Il

serait intéressant d'étudier la réceptivité de l'endomètre au moment de la biopsie avant utilisation des cellules en co-culture pour optimiser la qualité du tapis cellulaire.

Abstract

Introduction: Lot's of progress has been made in the process of in vitro fertilization (IVF) in the last years. However, the pregnancy rate is still low. There are two important issues in IVF: embryo development and implantation. One answer may be the endometrial autologue co-culture which could improve the embryo development and the implantation rate in many ways. The aim of this study is to assess the effect of co-culture quality on human embryo development and implantation rate. Materials and methods: The ovogen study was a randomized, double blind trial analysis. OvoGen compared the blastulation and the pregnancy rate in two randomized groups: the study group, with autologous endometrial co-culture and the control group, with conventional media.

The outcome of our study was to assess the correlation between the quality of autologous endometrial co-culture (cells confluence, rate of epithelial cells and stromal cells viability) and the embryo development.

Results: Fifty patients in the co-culture group were analyzed between 2012 to 2015 at the ovo clinic (Montreal, Quebec). 291 embryos were analyzed, each co-cultured on a monolayer endometrial cells. The embryo quality was not significantly linked with the co-culture quality ($p=0,65$ for the cells confluence, $0,25$ for the epithelial cells rate and $0,92$ for the stromal cells viability). On the other hand, the

pregnancy rate increased in correlation with the decreasing of the confluence ($p=0,022$) and the increase of stromal cells ($p=0,001$).

Moreover, the moment of the biopsy had an effect on the co-culture: when the biopsy was performed seven days after the ovulation, the quality of the co-culture was better (confluence increased $p=0,045$, epithelial cells increased $p=0,004$ and stromal cells viability increased $p=0,001$) than when the biopsy was done five days after the ovulation.

Discussion: There were no previous study on the quality of the co-culture and its effect on the embryo development. The fact that the pregnancy rate increased with the decrease of the confluence in the co-culture is interesting. Indeed, we could easily explain why a huge confluence could be prejudicial for the dialog between embryo and endometrium. Moreover, in accordance with previous experience, the day of the biopsy in the cycle is important for the quality of the endometrium. This is why the day of the biopsy may have an effect on the co-culture quality.

Conclusion: Our results show that the moment of the biopsy has an effect on the quality of the co-culture and that the quality of the co-culture has an effect on the pregnancy rate. It could be interesting to study the endometrium receptivity on the biopsy before the co-culture to optimize the quality and the benefit of the co-culture.

Liste des sigles et des abréviations

FSH : Hormone folliculo stimulante

LH : Hormone lutéinisante

GnRH : Hormone gonado libérante

FIV : Fécondation In Vitro

ICSI : Injection intra cytoplasmique de Sperme

PICSI : Injection de sperme intra cytoplasmique avec présélection

J5 : Cinquième jour post ovulation

J7 : Septième jour post ovulation

PMA : Procréation médicalement assistée

1. Introduction

1.1. Rappel de gynécologie

Le cycle menstruel

Le cycle menstruel chez la femme est complexe. Le contrôle hormonal du cycle se fait par le système hypothalamo-hypophysaire. L'hypothalamus libère de manière pulsatile la GnRH qui va stimuler l'hypophyse qui sécrète la FSH (hormone folliculo stimulante) et la LH (hormone lutéinisante) qui varient pendant le cycle menstruel. Ces hormones vont stimuler les cellules de la granulosa des follicules dans l'ovaire qui sécrètent les hormones sexuelles, l'œstradiol et la progestérone. Les hormones sexuelles ont un rétro contrôle négatif sur le système hypothalamo hypophysaire permettant de contrôler le taux d'hormones dans le sang.

Le premier jour du cycle se distingue par une chute brutale de progestérone en l'absence de grossesse liée à la dégénérescence du corps jaune entraînant les menstruations.

La chute de progestérone entraîne, par rétro contrôle négatif une augmentation de la FSH. Cette augmentation stimule les follicules contenus dans l'ovaire sensible à cette hormone. Plus le taux de FSH va augmenter plus les follicules vont grossir et mûrir et plus les cellules de la granulosa situées en périphérie de chaque follicule sécrètent de l'œstradiol. L'œstradiol a une action sur l'endomètre (prolifération vasculaire, épaissement, augmentation de la vascularisation) et sur la glaire

cervicale (perméabilisation). De même, par rétro contrôle négatif à nouveau, l'augmentation d'œstradiol entraîne une diminution de la sécrétion de FSH et une sélection de follicule(s) dominant(s) : seul le ou les follicule(s) le(s) plus sensible(s) continue(nt) à croître et mûrir et à sécréter de l'œstradiol. Les autres follicules s'atrophient. Cette phase est la phase folliculaire, elle peut avoir une durée variable. Aux alentours du 14^{ème} jour du cycle, la sécrétion d'œstradiol arrivant à un certain seuil va provoquer un pic de LH (hormone lutéinisante) qui va avoir pour effet, après 36h, de provoquer l'ovulation, c'est-à-dire l'expulsion de l'ovocyte du follicule dominant en croissance. L'ovocyte va ensuite cheminer dans la trompe, aidé par les cellules ciliées, pendant que le follicule dans lequel il était se transforme en corps jaune. Les cellules de la granulosa, sous l'effet de la FSH et de la LH vont maintenant sécréter de la progestérone. La progestérone a, comme l'œstradiol, une action sur la glaire cervicale et l'endomètre. Cette phase est la phase lutéale, elle a une durée fixe qui est la durée de vie du corps jaune d'environ 14 à 16 jours. A la dégénérescence du corps jaune, en l'absence de grossesse, la progestérone n'est plus sécrétée et chute ce qui provoque les menstruations. (Figure1)

En revanche, s'il y a fécondation, l'embryon sécrète les β hcg nécessaire au maintien du corps jaune et de la sécrétion de progestérone, il n'y a donc pas de menstruation mais une implantation et une grossesse.

La fécondation se fait souvent dans le tiers inférieur de la trompe de Fallope, pendant la migration ovocytaire. Un spermatozoïde, ayant traversé la glaire cervicale perméable en période d'ovulation a remonté l'utérus jusqu'à la trompe dans laquelle se trouve l'ovocyte et fragilise la membrane extérieure pour fusionner avec l'ovule.

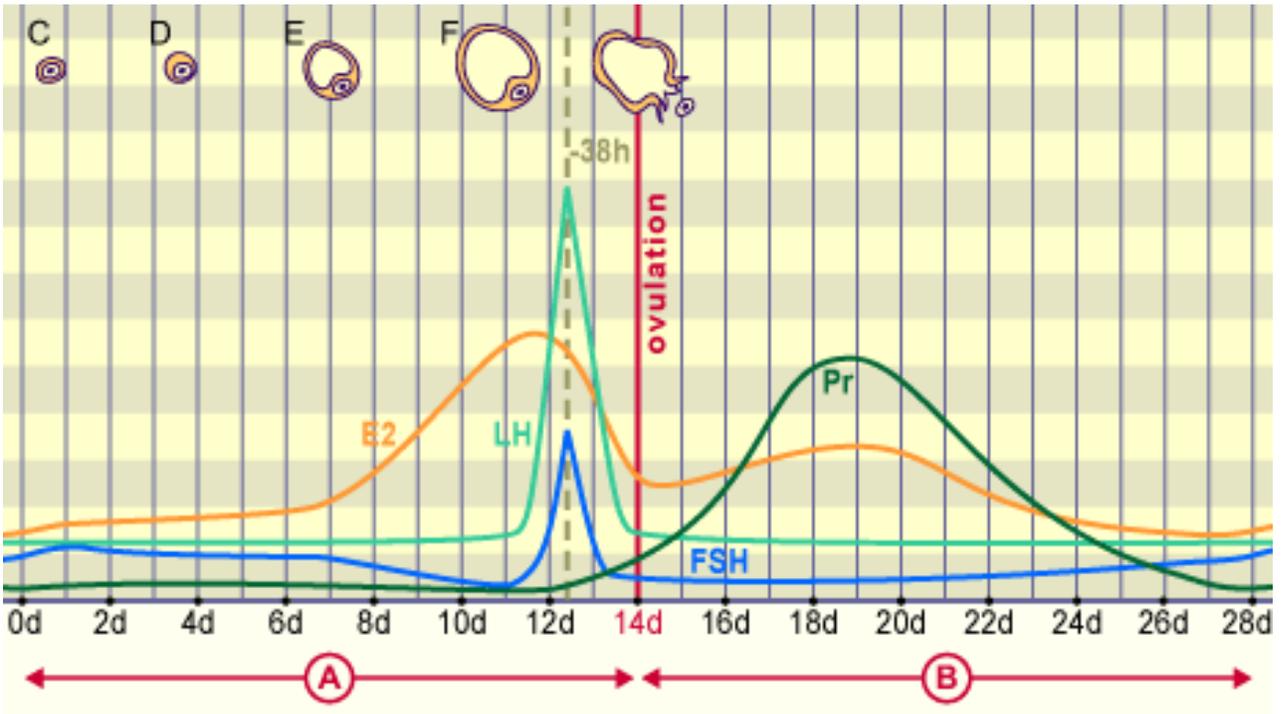


Figure 1 : le contrôle hormonal du cycle menstruel

1.2 La fécondation

Le développement ovocytaire et folliculaire

A la naissance, la petite fille a des ovocytes primaires, bloqués à ce stade jusqu'à la puberté. En murissant, ces ovocytes primaires vont s'entourer de tissu folliculaire pour former le follicule primordial. Chaque mois, pendant la folliculogénèse, seuls quelques follicules primordiaux se transforment en follicules primaires puis secondaires puis tertiaires (ou follicules de Graaf) sous l'influence des hormones sexuelles. Les follicules secondaires sont entourés de cellules de la granulosa sécrétant des hormones. Dans les follicules secondaires, entre ces cellules et l'ovocyte, une zone pellucide apparaît pour approvisionner l'ovocyte. Le follicule

tertiaire est pré ovulatoire, il se caractérise par une cavité folliculaire bordée par le cumulus oophorus (cellules de la granulosa). Les cellules périphériques sont très vascularisées et développées pour la sécrétion hormonale.

Juste avant l'ovulation, le cumulus oophorus se détache de la granulosa pour entourer l'ovocyte. Cette structure baigne dans la cavité folliculaire. Au moment de l'ovulation, le pic de LH provoque une maturation de l'ovocyte (transformation de l'ovocyte primaire en ovocyte secondaire) et une élévation de la progestérone dans le liquide folliculaire. La progestérone attire les spermatozoïdes vers l'ovocyte. Le pic de LH va ensuite induire une rupture du follicule et de la paroi de l'ovaire pour libérer l'ovocyte. Le pavillon de la trompe migre progressivement vers le follicule prêt à se rompre afin de recueillir l'ovocyte. Le contenu du follicule va se déverser dans la trompe adjacente. (Figure 2) L'ovocyte alors entouré de cumulus oophorus attend la fécondation et migre dans la trompe.

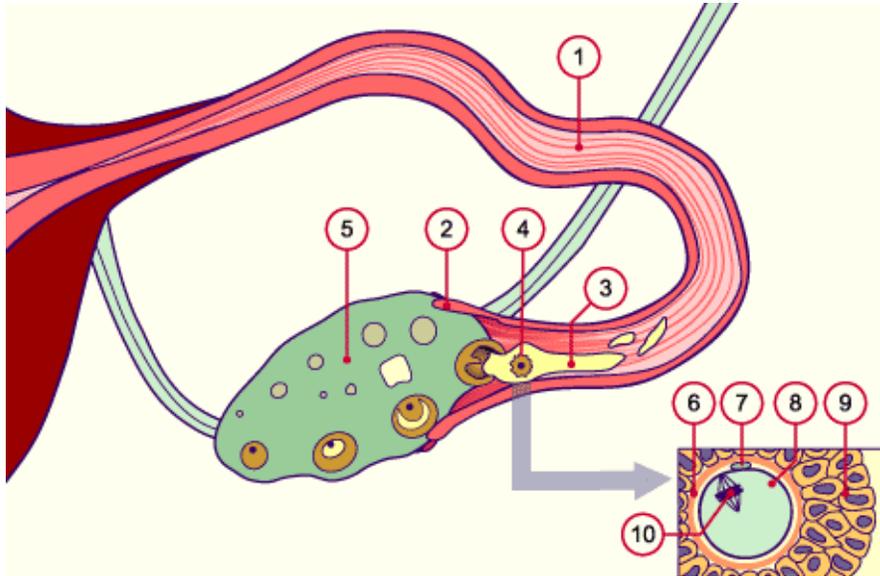


Figure 2 : Ovulation

- 1 : Trompe de Fallope
- 2 : Pavillon de la trompe
- 3 : Cumulus oophorus
- 4 : Ovocyte
- 5 : Ovaire

- 6 : Zone pellucide
- 7 : Premier globule polaire
- 8 : Ovocyte secondaire
- 9 : Cellule de la corona radiata
- 10 : Appareil microtubulaire

La spermatogénèse

Les spermatozoïdes subissent une première étape de maturation dans l'épididyme. L'activation de leur motilité a lieu au moment de l'éjaculation. Ils subissent ensuite la capacitation le long de leur trajet vers l'ovocyte dans le tractus féminin. La dernière étape de maturation se situe au contact des cellules du cumulus oophorus juste avant la fécondation. Cette dernière maturation, appelée réaction acrosomique, permet au spermatozoïde de pénétrer la zone pellucide. L'union du spermatozoïde et de l'ovule va provoquer un durcissement de la zone pellucide empêchant la polyspermie dans l'ovule.

Les membranes du spermatozoïde et de l'ovule vont fusionner pour que le noyau contenant les chromosomes paternels entre dans l'ovule. Le flagelle du spermatozoïde et les mitochondries paternelles sont éliminés.

Le développement embryonnaire pré-implantatoire

Les premiers stades de développement de l'embryon sont génétiquement dépendants de l'ovocyte. Il s'agit de divisions cellulaires successives des cellules de l'ovocyte en cellules totipotentes formant ainsi un ensemble de la même taille que l'ovocyte initial. La division cellulaire commence 24h après la fécondation. C'est la segmentation. Chaque cellule fille est deux fois plus petite que la cellule mère car la zone pellucide est inextensible. L'embryon passe du stade 2 cellules à 4, 8 et 16 cellules en quelques jours tout en continuant sa migration tubaire vers l'utérus.

(Figure 3)



Figure 3 : Division de l'embryon en 4 cellules

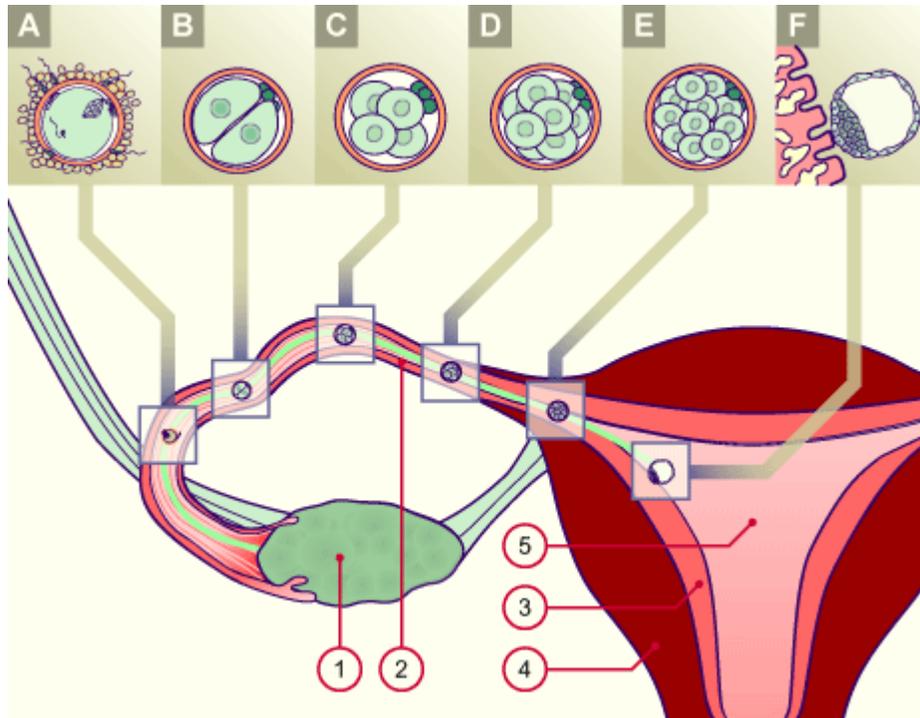


Figure 4 : Migration de l'embryon dans la trompe et développement embryonnaire

- 1 : ovaire
- 2 : trompe
- 3 : endomètre
- 4 : myomètre
- 5 : cavité utérine

- A : fécondation
- B : Embryon stade 2 cellules
- C : Embryon stade 4 cellules
- D : Embryon stade 8 cellules
- E : Embryon stade Morula
- F : Embryon stade Blastocyste

Ce n'est que vers le troisième ou quatrième jour après l'ovulation que l'embryon arrive dans la cavité utérine, préparée par la progestérone à l'implantation. (Figure 4)

A 96h de la fécondation, l'embryon est au stade morula : environ 30 cellules sphériques qui forment un ensemble toujours de la même taille que l'ovocyte initial.

La morula va ensuite subir un phénomène de cavitation : ses cellules vont se resserrer (compaction) pour laisser la place à une cavité qui s'emplit de liquide (le blastocèle). L'embryon devient alors blastocyste. Le volume de l'embryon commence à croître dès que la cavité se forme. Ses cellules sont séparées en trophoblaste ou

trophectoderme qui donneront le placenta provenant du fœtus et bouton embryonnaire ou embryoblaste qui donnera le fœtus.

Au cinquième jour environ, la cavité contenue à l'intérieur du blastocyste s'expand, la zone pellucide distendue se rompt et le blastocyste sort de la zone pellucide en se déformant, c'est l'éclosion du blastocyste (ou hatching). (Figure 5)

C'est une étape primordiale pour la nidation.



Figure 5 : Eclosion du blastocyste

Au sixième jour, l'embryon entre en contact avec la muqueuse utérine, c'est l'implantation.

1.3. Implantation

Endomètre

L'utérus est composé de trois couches, la séreuse, qui entoure et protège l'organe, le myomètre, le muscle utérin responsable des contractions et l'endomètre, la muqueuse utérine interne.

L'endomètre est hormono-dépendant et subit des modifications pendant le cycle menstruel. Il a pour but de recevoir l'embryon lors de l'implantation et d'aider son développement pendant la grossesse. Il est le siège d'une réaction immunitaire très importante pendant l'implantation et est le lieu d'échange entre la mère et le fœtus.

Il est composé d'une couche basale, d'une couche fonctionnelle et différents types de cellules. Les cellules épithéliales (glandes) qui sécrètent les facteurs de croissance et cytokines, et les cellules stromales, de soutien et nourricières des cellules épithéliales. Les deux types de cellules sont essentiels à l'implantation.

Pendant la phase folliculaire du cycle menstruel, l'endomètre subit des modifications morphologiques et prolifère sous l'effet de l'œstradiol. Les cellules épithéliales deviennent ciliées.

Pendant la phase lutéale, l'endomètre se prépare à l'implantation, il mûrit sous l'effet de la progestérone. Les noyaux des cellules épithéliales s'arrondissent et sécrètent du mucus chargé en glycogène. Les cellules Natural Killer qui sont des cellules du système immunitaire sont très importantes dans l'implantation et permettent le remodelage des artères spiralées utérines. Une réaction immunitaire

forte est indispensable à l'implantation. Si les cellules immunitaires sont immatures ou absentes, l'endomètre ne sera pas réceptif. La fenêtre d'implantation est le moment pendant lequel l'endomètre est prêt à recevoir l'embryon. Elle dure quelques jours entre J19 et J23 du cycle généralement (entre 5 et 9 jours après l'ovulation). En dehors de cette fenêtre, l'endomètre n'est plus réceptif et, au contraire, se défend contre toute agression, infection ou implantation. La réceptivité endométriale est la capacité de l'endomètre à permettre l'implantation embryonnaire. Elle s'évalue pendant la fenêtre d'implantation et a un grand rôle dans la nidation et la grossesse. Elle n'est encore pas totalement connue. La qualité d'implantation et de réceptivité endométriale diminue avec l'âge.

En l'absence de grossesse, et suite à la chute de progestérone, la partie superficielle (fonctionnelle) de l'endomètre s'élimine, ce sont les menstruations.

L'implantation du blastocyste

L'implantation embryonnaire est une partie très importante de la fertilité humaine. Ses mécanismes précis ne sont pas encore totalement connus. Il existe des échanges importants entre les cellules déciduales de l'endomètre maternel et les cellules trophoblastiques de l'embryon par différents facteurs de croissance. Dès son éclosion, le blastocyste sécrète des molécules comme les hcg ou l'interleukine agissant sur l'endomètre. Le blastocyste exprime aussi des récepteurs pour des facteurs de croissance comme le facteur de croissance épithélial et le facteur d'inhibition de la leucémie (LIF).

Le blastocyste va s'accoler à la partie fonctionnelle de la cavité utérine du côté de son pôle embryonnaire au moment de son éclosion (libération hors de la zone pellucide qui empêchait l'implantation tant que l'embryon n'était pas dans l'utérus).

Le trophoblaste adhère puis envahit la muqueuse utérine en sécrétant des facteurs induisant l'apoptose des cellules épithéliales de l'endomètre pour pénétrer jusqu'aux cellules stromales et aux vaisseaux endométriaux. Il agit comme un tissu tumoral. Il va détruire la membrane basale en sécrétant l'intégrine par exemple et accéder au tissu conjonctif. La muqueuse utérine réagit à l'implantation par la réaction déciduale, qui aide l'embryon à s'implanter.

Le trophoblaste envahit les vaisseaux de la muqueuse utérine pour former une néo-vascularisation placentaire.(2)

1.4. La procréation médicalement assistée (PMA)

Généralités

La procréation médicalement assistée (PMA) est la science de l'infertilité. C'est une spécialité qui aide les patients à procréer. Les causes d'infertilité sont multiples et les traitements de PMA aussi. Ils pallient aux anomalies des différents stades de la reproduction humaine.

On peut stimuler les ovaires pour créer une folliculogénèse artificielle d'un ou plusieurs follicules avec du citrate de clomifène ou des gonadotrophines (FSH) recombinante ou humaine. L'ovulation peut être déclenchée artificiellement par du citrate de clomifène. Dans les cycles artificiels de stimulation ovarienne, l'ovulation

peut être déclenchée par une injection de choriogonadotrophines alpha ou d'agoniste de la LH-RH.

Le passage du col des spermatozoïdes peut être facilité par des inséminations intra utérines après stimulation ovarienne.

Dans ces cas, la fécondation est in vivo ainsi que le développement embryonnaire et l'implantation sur lesquels les médecins n'ont pas de prise.

FIV

La fécondation in vitro est le traitement de nombreuses étiologies d'infertilité comme des anomalies importantes des spermatozoïdes, les obstructions tubaires, l'endométriose ou encore une infertilité inexplicée.

Elle comporte plusieurs étapes essayant de reproduire au plus proche les étapes in vivo. La différence réside dans le fait que plusieurs ovocytes sont obtenus pour la création de plusieurs embryons pour optimiser les chances de grossesse.

Tout d'abord les ovaires sont stimulés par des gonadotrophines. La stimulation commence au début du cycle naturel de la patiente. Les doses sont adaptées à la réaction des ovaires qui sont monitorés par échographie (taille des follicules, épaisseur de l'endomètre) et prise de sang (œstradiol, progestérone, LH). Une stimulation par LH peut être ajoutée si besoin. Quand le follicule paraît mature (de bonne taille et avec une sécrétion appropriée d'œstradiol), on déclenche l'ovulation par choriogonadotrophine alpha, le plus souvent. 36h après le déclenchement, a lieu la ponction ovocytaire. Elle consiste en l'aspiration du liquide contenu dans les follicules ovariens par une aiguille trans vaginale et trans ovarienne de manière écho

guidée. Elle permet le recueil des ovocytes après séparation des ovocytes des cellules du cumulus les entourant. On procède ensuite à la fécondation in vitro en mettant en contact l'ovocyte avec les spermatozoïdes ou en injectant le spermatozoïde choisi directement dans l'ovocyte (ICSI : intra cytoplasmic sperm injection). Dans les cas d'ICSI, les ovocytes sont d'abord dénudés et triés en fonction de leur maturité. Les spermatozoïdes peuvent être choisis de différentes manières après lavage et tests de migration survie, notamment par PICSI (élection de spermatozoïde mur et compétent par un gel de hyaluronane).

Le développement embryonnaire se fait ensuite in vitro dans des incubateurs à 37°C avec des conditions en O₂ et Co₂ proches de celles in vivo. Ils baignent dans un milieu de culture adapté pour les nourrir. Les embryons sont ensuite classés à l'aide d'une étude de Gardner et al en 1999.(3) (4)(5) Le transfert du ou des embryon(s) jugé(s) le(s) mieux développé(s) a ensuite lieu à J3 ou J5. Le transfert des embryons se fait à l'aide d'un cathéter qui passe à travers le col utérin, de manière à déposer l(es) embryon(s) dans le fond utérin sans toucher la paroi (pour éviter les contractions utérines). Ce transfert se fait de manière écho guidée ou non.

Les blastocystes peuvent recevoir une aide à l'éclosion (hatching assisté) s'ils le nécessitent. Un orifice est alors créé artificiellement par laser dans la zone pellucide pour aider le blastocyste à éclore.

Après le transfert d'embryon, les patientes reçoivent souvent un traitement par progestérone comme support de la phase lutéale. L'implantation se fait forcément in vivo et il n'y a pas de technique ou de traitement permettant d'assister l'implantation embryonnaire. On peut uniquement ne pas implanter l'embryon dans les cas où

l'endomètre paraît non réceptif. Il est observé en échographie : certaines études ont montré que plus il est épais plus il est réceptif (au moins >6mm). Son type à l'échographie (homogénéité et échogénicité) peut nous renseigner sur sa réceptivité : aspect en triple ligne par exemple. Si l'endomètre paraît non réceptif ou s'il y a des embryons surnuméraires jugés de « bonne qualité », ceux-ci peuvent être congelés pour un transfert futur sur un cycle synchronisé. La congélation se fait de deux manières. Premièrement par congélation lente : l'eau de l'embryon est remplacée par un cryoprotecteur et l'embryon est ensuite placé dans une paillette et sa température est progressivement diminuée jusqu'à atteindre -196°C . Il est ensuite conservé à cette température dans l'azote liquide. La décongélation se fait de la même manière par paliers successifs. Deuxièmement, la vitrification, qui est une technique de congélation plus rapide. Les embryons, après avoir été cryoprotégés, sont placés directement dans l'azote liquide à -196°C dans des paillettes sécurisées.

Le développement embryonnaire et son implantation sont deux enjeux en fécondation in vitro

Culture embryonnaire in vitro

Les embryons nécessitent beaucoup de soin dans leur manipulation et leur culture. Pour optimiser leur développement, ils doivent être cultivés dans un milieu stérile et une température de 37°C doit être maintenue. De plus, le pH doit rester entre 7,2 et 7,6 durant les manipulations. Il existe plusieurs milieux de culture utilisés pour le développement embryonnaire avant le transfert intra utérin. En effet, en se développant, les embryons produisent des substances toxiques qui pourraient leur nuire. Cependant, ils sécrètent aussi des protéines et des facteurs de croissance nécessaire à leur propre développement. De plus, les sources du métabolisme de l'embryon sont différentes en fonction des phases de développement.(6) Les milieux de culture actuels contiennent des sels (calcium, magnésium...) de l'albumine, des sources d'énergie (pyruvate, lactate, glucose...), du sérum (humain ou synthétique), des acides aminés, des antibiotiques, des vitamines, des facteurs de croissance, des nucléotides, des solutions buffer à différentes concentrations. Tous ces éléments sont nécessaires à la croissance de l'embryon à différents stades. Il existe deux sortes de milieu de culture : soit le milieu standard universel dont la composition contient tout ce qui est nécessaire au développement embryonnaire soit des milieux de culture séquentiels, c'est-à-dire différents pour les différents stades de développement de l'embryon. Bien qu'il ait été montré qu'enlever le glucose et maintenir le pyruvate pendant les premiers jours de développement et réintroduire le glucose à partir du stade 8 cellules augmenterait le taux de blastulation, changer les embryons de milieu en cours de culture pourrait causer un stress osmotique, oxydatif, et thermique, désavantageux à leur développement. Certains embryologistes ont donc fait le choix

d'un milieu de culture global avec ajout de milieu régulièrement sans changer totalement les embryons de milieu de culture. Le choix de méthode et milieux de culture est laissé aux embryologistes de chaque centre. Le problème scientifique principal des milieux de culture embryonnaire en fécondation in vitro est la commercialisation de ceux-ci et la non transparence de leur composition ne permettant pas de comparaison scientifique randomisée claire.(7)

Les conditions d'incubation embryonnaires se sont améliorées. Ils étaient classiquement contrôlés uniquement en CO₂ (5-6%). La concentration d'oxygène était celle de l'air (19-20%). Or, on sait que la concentration en oxygène intra utérine est de 2 à 8%. Il existe maintenant des incubateurs tri-gaz contrôlés en O₂ (6%) par de l'azote et en CO₂ (5%). Selon une étude récente, la qualité embryonnaire et le taux d'implantation est meilleur quand les embryons sont incubés à 5% O₂ versus 20% d'O₂ mais les incubateurs tri-gaz sont plus chers. L' étude montre aussi que, plus que la concentration d'oxygène, c'est sa variation qui nuit à la culture embryonnaire.(8)

Dans une méta analyse de 2011, les résultats étaient encore controversés quant à la meilleure concentration en oxygène nécessaire au développement embryonnaire.(9)

Pour éviter au maximum le stress transmis aux embryons, il existe maintenant des incubateurs contenant une caméra (embryoscope) permettant d'observer la croissance embryonnaire en évitant de sortir les embryons de l'incubateur.

2. Introduction générale

La fécondation in vitro a fait beaucoup de progrès ces dernières années.

On maîtrise de plus en plus le processus à chacun de ces stades. De nouveaux protocoles de stimulation ovocytaire plus adaptés à chaque patiente ont vu le jour, avec les traitements par gonadotrophines, les protocoles antagonistes, SMART (utilisant l'effet flare up : une augmentation brutale et transitoire de la LH et de la FSH dans la circulation sanguine engendrée par les agonistes de la GnRH). De nouvelles méthodes d'induction de l'ovulation ont été mises en place pour éviter les hyperstimulations ovariennes.

Les techniques de fécondation in vitro par ICSI (intra cytoplasmic sperm injection) ou PICSI, une micromanipulation qui permet la sélection du spermatozoïde, sont utilisées pour augmenter le taux de fécondation des ovocytes recueillis. De même, des nouvelles techniques « hatching assisté » peuvent maintenant être réalisées. Les techniques de congélation des ovocytes, des spermatozoïdes ou des embryons par vitrification ont vu le jour pour augmenter la qualité des cellules après décongélation.

Le développement de l'embryon jusqu'au stade blastocyste (J5 ou 6 après fécondation) est de plus en plus utilisé pour transférer l'embryon dans l'utérus au stade où il y arrive physiologiquement in vivo. En effet, l'embryon est dans les trompes de fallope pendant sa première partie de développement et n'arrive dans la cavité utérine, en contact avec l'endomètre, qu'après avoir été compacté (au quatrième jour environ).

L'embryon se développe grâce à l'activation du génome de l'ovocyte dans les trois premiers jours puis grâce à l'activation du génome mâle à partir du troisième jour. Si

l'on sélectionne et transfère un embryon au troisième jour de fécondation, on ne sait pas comment le développement et l'activation du génome mâle va se faire in vivo. De plus, transférer l'embryon dans l'utérus à un stade trop précoce pourrait arrêter son développement en le privant du milieu de culture qu'il aurait trouvé dans la trompe à ce stade in vivo. La sélection et le transfert d'embryon au stade blastocyste augmenterait donc le taux d'implantation (nombre de grossesse clinique sur nombre d'embryon transféré). De plus la sélection des embryons à un stade plus tardif permettrait l'élimination des embryons ayant des anomalies chromosomiques et arrêtant leur développement à un stade précoce.

Les taux d'implantation post transfert d'un embryon à J2-J3 était de 5 à 30%. La technique consistait alors à transférer plusieurs embryons à un stade précoce (J2 J3) pour compenser les mauvais taux d'implantation. Aux états unis en 1995, le nombre moyen d'embryon transféré chez des patientes de tout âge était de 4! Ces transferts multiples avaient de hauts risques de grossesse multiples, induisant un risque pour la mère et pour les enfants à naître. Transférer un embryon à un stade tardif permettrait donc un SET (Single Embryo Transfer) sans diminuer les chances de grossesse (taux d'implantation supérieur à 50%) tout en minimisant les risques de grossesse multiple. (10) Le taux de blastulation (nombre d'embryon s'étant développé correctement jusqu'au stade J5 sur le nombre d'embryon à J2) est donc très important en fécondation in vitro.

Un des facteurs principal du succès de fécondation in vitro, via le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste, est le choix du milieu de culture de l'embryon avant transfert. Les milieux de culture n'ont pas cessé d'évoluer pour

améliorer le développement embryonnaire et les taux de grossesse en fécondation in vitro. La co-culture, culture des embryons sur un tapis de cellules endométriales maternelles, pourrait améliorer le développement embryonnaire par la sécrétion de cytokines et de facteur de croissance par les cellules de l'endomètre. Le but de la co-culture serait de permettre d'améliorer le développement embryonnaire et le taux de blastulation, en améliorant les milieux de culture des embryons. Cela pourrait augmenter le taux d'implantation et donc les taux de grossesse en fécondation in vitro. L'étude présentée est une sous-analyse d'un essai clinique randomisé en double aveugle comparant les taux de grossesse et la qualité embryonnaire en fécondation in vitro d'embryons sur tapis de cellules endométriales autologues versus d'embryons cultivés sur milieu conventionnel.

L'objectif de cette étude est d'analyser la qualité des tapis cellulaires utilisés par rapport à la qualité embryonnaire.

3. Bibliographie

De nombreuses études sur l'amélioration des milieux de culture embryonnaire en fécondation in vitro ont été faites. Pour reproduire les échanges entre les embryons et les cellules du tractus génital féminin (cellules des trompes et de l'utérus), des milieux contenant des cellules en « co-culture » avec les embryons ont été étudiés.

Depuis 1965, il a été montré une augmentation du taux de blastulation des embryons de souris en les cultivant sur des lignées de cellules 'immortal helper' (11) Il y a eu ensuite de multiples expérimentations sur l'utilisation de cellules animales en co-culture avec des embryons humains pour améliorer leur développement. Les résultats sont discordants. Les embryons humains ont été mis en culture avec des cellules utérines fœtales bovines (taux de grossesse doublé à 35%) (12). L'expérience a aussi été faite avec des cellules bovines épithéliales tubaires : amélioration du taux de grossesse de quasiment deux fois dans un étude de Wiemer et al (13) alors que Tucker et al ne voient pas de différence entre les deux groupes avec les mêmes cellules(14). Dans cet article, Tucker décrit deux essais cliniques randomisés, un comparant la co-culture à un milieu conventionnel et l'autre comparant l'éclosion assistée (hatching) à un groupe qui n'en n'avait pas. Il n'y a pas de différence significative entre les groupes dans sa population d'étude, mais Tucker émet l'idée que ces techniques pourraient être avantageuses pour certaines catégories de patiente. En particulier l'éclosion assistée pour les patientes de plus de 35 ans. Des cellules 'vero' de rein de singe ont été utilisées en co-culture, les résultats étaient discordants : une étude montrait une augmentation du taux de

grossesse dans le groupe co-culture en particulier chez les patientes ayant déjà eu plusieurs échecs d'implantation, (15) mais d'autres études randomisées ne montraient pas de différence de taux de grossesse. Ces études montraient, en revanche, plus de blastocystes formés dans le groupe co-culture avec cellules vero. (16) (17) D'autres auteurs ont tenté la co-culture avec des cellules de foie de rat et éclosion assistée (18) mais ces études ne montraient pas de différence de taux de « beaux embryons » ni de taux de grossesse entre les groupes mais seulement une diminution de la fragmentation des embryons. Dans ces différentes études, des cellules animales étaient utilisées en co-culture, les essais n'étaient pas contrôlés, les embryons étaient transférés à J3 et ne restaient qu'une cinquantaine d'heures en co-culture. Les auteurs discutaient l'idée que la co-culture pourrait être plus efficace pour le développement embryonnaire au delà du jour 3.

En 2002, la FDA (food and drug administration) a recommandé de ne pas utiliser de cellules animales en co-culture avec des embryons humains de peur de transmettre des maladies animales à l'homme.

En 1999, de nouveaux milieux de culture séquentiels améliorés ont vus le jour. Ils avaient la même efficacité pour le taux de blastulation (de 68%) que les milieux avec ajout de cellules animales en co-culture (vero cells) (19).

Les recherches ont donc continué pour améliorer la qualité embryonnaire avec des cellules humaines en co-culture. Les cellules utilisées en co-culture étaient humaines mais hétérologues (ne provenant pas de l'utérus porteur). La culture des embryons sur cellules humaines hétérologues, de l'ampoule de la trompe de femmes fertiles venant pour hystérectomie, améliorerait la qualité embryonnaire au stade

précoce (cavitation) mais pas au stade blastocyste. Les embryons se développaient plus vite au contact des cellules de l'ampoule de la trompe jusqu'au stade de morula mais l'expansion embryonnaire du blastocyste semblait mettre en jeu d'autres mécanismes et d'autres interactions (20). Du serum maternel était ajouté dans les deux groupes au milieu de culture embryonnaire. Dans une autre étude, des embryons surnuméraires donnés à la recherche ont été utilisés, il n'y a donc pas eu de transfert. L'objectif était de voir l'amélioration du développement embryonnaire (en comparant le nombre de cellules par blastocyste) en laissant les embryons se développer jusqu'au stade blastocyste pour augmenter le temps de co-culture (de J2 à J5). Dans cette étude, la co-culture avec les cellules de la trompe de fallope augmentait le nombre de cellules par blastocyste uniquement quand les embryons étaient mis en co-culture à un stade précoce (dès le deuxième jour post fécondation) (21). De plus, l'amélioration du taux de bastulation était moins important dans le sous groupe de patientes ayant une infertilité inexplicée. Ceci montre que le développement embryonnaire dépend d'autres aspects que le milieu de culture in vivo. Une autre étude en 1992, a montré l'amélioration de la qualité embryonnaire mais les embryons étaient transférés précocement dans la trompe ou en transfert séquentiel, ce qui n'est plus utilisé de nos jours. (22) La co-culture avec fibroblastes humains a montré des résultats différents des autres études sur la co-culture : pas de différence significative de taux de grossesse entre les groupes (23) avec un transfert ou une congélation à J3 et seulement 48h de contact avec les fibroblastes. Il n'y avait pas non plus de différence de qualité d'embryons entre les deux groupes.

Des cellules ovariennes autologues ont ensuite été utilisées. Dans une étude, des cellules du cumulus ovocytaire ont été ajoutées dans milieu de culture, sans faire de tapis cellulaire pour simplifier la co-culture. De plus ces cellules étaient autologues (provenait de la mère) ce qui diminuait le risque d'infection. Cette co-culture autologue augmentait la qualité embryonnaire et le taux de grossesse (24) Dans cette étude, les embryons n'étaient pas en contact direct avec les cellules du cumulus ovocytaire. Selon les auteurs, le contact direct n'est pas nécessaire en co-culture car les mécanismes améliorant la qualité embryonnaire sont des sécrétions de facteur de croissance et une détoxification du milieu pouvant se faire sans contact. Pour mieux comprendre ce mécanisme, une autre étude sur modèle animal a montré le bénéfice de la co-culture avec ou sans contact cellulaire (une membrane était insérée entre les cellules et les embryons empêchant le contact direct mais laissant passer le milieu de culture)(25). Un autre essai clinique, randomisé, a été mené sur un grand nombre de patientes ayant des échecs d'implantation à répétition (au moins trois). Les embryons de ces patientes étaient randomisés dans le groupe sans co-culture ou dans le groupe co-culture avec cellule du cumulus ovocytaire. La différence de taux de blastulation et de taux de grossesse était significative entre les deux groupes mais les transferts étaient faits à des jours différents (J3 groupe contrôle et J5-J6 groupe co-culture). L'étude portait aussi sur l'expression des gènes des cellules de soutien. Dans cette étude, les cellules du cumulus exprimaient les gènes LIF (leukemia inhibitor factor) et platelet activating factor receptor (PAF-R), qui pourraient faire partie des facteurs de croissance améliorant la qualité embryonnaire.(26)

Des cellules de la granulosa de patientes ont été mises en co-culture dans plusieurs essais cliniques non randomisés. Ceux-ci ont montré que la mise en contact des embryons avec des cellules de la granulosa améliorait la qualité embryonnaire (plus de blastulation, plus de grade de bonne qualité) mais pas le taux de grossesse. (27) (28) Dans ces essais, les cellules ovariennes étant autologues, c'est-à-dire provenant de la patiente portant la grossesse et prélevées au moment de la ponction. Ces co-cultures étaient simples à réaliser, sans congélation des cellules, et sans risque infectieux. Mais aucune de ces études n'était assez bien menée pour prouver une augmentation du taux de grossesse significatif.

Des études ont même été menées avec des cellules de cancer de l'ovaire de manière expérimentale sur des dons d'embryon. La co-culture augmentait le taux de blastulation mais il n'y avait pas de résultat sur les taux de grossesse, car les embryons n'étaient pas transférés. (29)

En 2008, une méta analyse a étudié les essais randomisés étudiant la co-culture hétérologue et autologue de cellules humaines et animales. Sur 9 essais randomisés comparant les taux de grossesse, 3 montraient une amélioration grâce à la co-culture, quelle qu'elle soit, et 6 études montraient seulement une tendance à l'amélioration des taux de grossesse. Mais le taux de grossesse était statistiquement augmenté dans la méta analyse dans le groupe co-culture. La méta analyse permettait d'augmenter la puissance statistique car peu d'études citées avaient une taille d'échantillon appropriée à l'analyse statistique menée. (30) Ces différentes études sont difficiles à comparer car les cellules utilisées en co-culture sont très différentes (cellules ovariennes humaines et bovines, cellules utérines bovines,

cellules vero, cellules de cancer ovarien, cellules de foie de rat, fibroblastes humains et cellules de la granulosa autologue humaines). De même, les milieux de culture conventionnels auxquels sont comparés les co-culture sont aussi disparates.

De 1995 à 2010, il y a eu de multiples études sur la co-culture autologue avec cellules endométriales. Cette co-culture est tentante car elle est physiologique, (cellules utérines de la mère utilisées) autologue donc sans risque infectieux (surtout par rapport aux co-culture animales proposées) et justifiée partiellement par le dialogue embryon- cellules utérines connu. De plus, la biopsie endométriale faite aux patientes dans les co-cultures autologues ne nuit pas et pourrait, au contraire, augmenter le taux d'implantation embryonnaire.

Finalement, toutes les études sur le sujet ont montré l'innocuité de la co-culture endométriale autologue. Une étude a réalisé le suivi des grossesses après transfert d'embryon développé en co-culture autologue jusqu'à la naissance pendant 5 ans et a montré qu'il n'y avait pas plus de malformation néonatale dans le groupe co-culture.(31) Cette méthode, si elle n'a pas fait la preuve de son efficacité n'est donc pas nuisible.

Une seule étude était randomisée, les ovocytes d'une même patiente étaient randomisés dans le groupe co-culture ou culture en milieu conventionnel. La patiente était donc son propre témoin. Cette étude montrait une diminution du taux de fragmentation des embryons sans montrer d'amélioration du taux de grossesse dans le groupe co-culture.(32)

Les premières études sur la co-culture ont largement décrit la technique de la biopsie d'endomètre, la technique de culture cellulaire et de la congélation et

décongélation des cellules. Lors de la culture et après purification des cellules, l'ensemencement se fait en part égale de cellules stromales et endothéliales. En effet, physiologiquement, la muqueuse utérine en phase lutéale contient environ la moitié de chaque type de cellules. Malgré cela, au moment de déposer les embryons sur le tapis de cellules endométriales maternelles, la confluence des cellules étaient de 50 à 75% et après le transfert embryonnaire, le taux de cellules épithéliales était de 25 à 50% seulement. Les embryons dans les deux groupes étaient incubés à 37°C et à 5% d'O₂. Le biais majeur était que le milieu conventionnel n'était pas le même que le milieu utilisé dans la co-culture. Les résultats montraient une augmentation du nombre de cellules embryonnaires et leur qualité mais pas le taux de grossesse. Ces études non randomisées manquaient peut être de puissance. (33) Après une étude sur la population générale, les auteurs ont décidés de s'intéresser à la population de patientes avec échec de fécondation à répétition ou de mauvaise qualité embryonnaire. Les résultats étaient les mêmes, amélioration de la qualité des embryons sans amélioration du taux de grossesse significative.(34) (35) (36) (37)

Quelques études ont retrouvé un taux de grossesse significativement amélioré par la co-culture. L'une est une étude rétrospective avec un transfert des embryons à J4 (38), et l'autre ne montrait ce résultat que pour les patientes avec un antécédent de pauvre qualité embryonnaire sans groupe contrôle. (39)

Certaines études se sont intéressées à comparer les tapis cellulaires provenant de patiente fertile ou de patiente en échec d'implantation. Les tapis avaient la même confluence et la même morphologie. De même, les tapis provenant de biopsie fraîche ou congelée ne différait en rien. Cela peut laisser penser que même un endomètre

d'éventuelle moins bonne qualité (patientes en échec d'implantation) peut donner un tapis cellulaire en co-culture correct en termes de nombre et de morphologie des cellules. De plus, la congélation des cellules ne change pas la qualité des tapis ce qui permet de faire des co-cultures endométriales autologues.

Ces études ont aussi montré que l'augmentation de l'implantation embryonnaire était plus franche chez les patientes avec don d'ovocyte que les patientes en cycle stimulé. On sait que la qualité de l'endomètre est un facteur majeur de l'implantation au même titre que la qualité embryonnaire. On peut penser que les patientes en don d'ovocyte ont un endomètre plus optimal à la nidation car elles reçoivent moins d'hormones. (35) (40)

Une autre étude a montré l'efficacité significative de la co-culture sur la diminution du taux de fausse couche (ajusté sur l'âge et le nombre d'échec de FIV). Mais cette étude n'était pas randomisée. (41)

Un groupe d'auteur a proposé une co-culture avec des cellules endométriales non autologues (lignée cellulaire), pour éviter les co-culture patiente-dépendante. Selon eux, une mauvaise qualité endométriale pourrait donner un mauvais tapis cellulaire, mais cela empêche aussi l'éventuel avantage de la biopsie. Cette étude montre une tendance à l'amélioration de la qualité embryonnaire et des taux de grossesse chez des patientes d'âge avancé ou avec un mauvais pronostic embryonnaire.(42)

En conclusion, toutes ces études sur la co-culture autologue montrent une amélioration de la qualité embryonnaire et avec la co-culture. Mais souvent ces études manquent de puissance et de validité externe car s'intéresse à la population spécifique des échecs d'implantation à répétition. De plus, ces essais n'étaient pas

randomisés, les patientes étaient leur propre contrôle (comparaison avec le cycle précédent ou avec les embryons du même cycle). Même si ces résultats sont encourageants, il n'y a pas d'augmentation de taux de grossesse démontrée par des essais cliniques randomisés bien menés. La co-culture étant souvent lourde financièrement pour les centres de procréation médicalement assistée, elle ne sera recommandée et utilisée que si l'augmentation du taux de grossesse est évidente.

Finalement, il serait important de s'appuyer sur plusieurs essais randomisés bien menés sur une population générale pour prouver l'innocuité et le rôle positif de la co-culture autologue endométriale sur la qualité embryonnaire, l'implantation et le taux de grossesse. On sait aussi qu'une mauvaise qualité de l'endomètre pourrait jouer sur le rôle de la co-culture et il serait donc intéressant d'évaluer la réceptivité de l'endomètre lors de la biopsie.

4. Matériel et méthodes

Le projet de recherche a été proposé aux patientes (entre 18 et 43 ans) en fécondation in vitro à la clinique ovo, ayant une prescription de protocole antagoniste ou smart. Les patientes devaient avoir un SET (Single Embryo Transfer). Elles devaient avoir une bonne réserve ovarienne dans les 12 mois précédents le recrutement (AMH >1ng/mL, compte folliculaires antraux ≥ 12 ou au moins 4 beaux embryons au cycle de FIV précédent, c'est-à-dire des embryons à J2 d'au moins 6 à 8 cellules et grade 2 ou mieux et avec une FSH <10 UI/L), une cavité utérine normale

(échographie 3D, hystérocopie, hystérosonographie normale dans les deux ans précédant le recrutement) et des cycles réguliers (maximum 40 jours). Les patientes devaient avoir eu au maximum 3 cycles de Fécondation In Vitro avec transfert.

Les critères d'exclusion étaient : aménorrhée, oligoaménorrhée ou cycles anovulatoires, endométriose sévère, endométrite chronique non traitée, hydrosalpinx, cavité utérine anormale, syndrome d'asherman, fibromes intra muqueux ou polypes de plus d'1cm, besoin de PESA ou TESA pour le conjoint, utilisation d'anticoagulants ou une des sérologies syphilis, VIH, VHB ou VHC positive.

Les patientes signaient ensuite le formulaire de consentement, après réflexion, et était recrutée.

Une fois recrutées, les patientes avaient un premier rendez vous pour le dépistage mycoplasme (prélèvement vaginal) et chlamydia (prélèvement urinaire).

Si le prélèvement mycoplasme revenait positif, la patiente et son conjoint étaient traité par antibiotique per os 7 jours selon les recommandations canadiennes. Il n'y a pas eu de prélèvement chlamydia positif. Les participantes commençaient ensuite une courbe de température au début du cycle précédent le cycle de fécondation in vitro, afin de déterminer la date de leur ovulation. Elles devaient prendre leur température tous les matins à heure fixe avec le même thermomètre pour détecter l'élévation de température à l'ovulation (de 0,5 degré en moyenne) due à la sécrétion de progestérone. Un document explicatif sur la manière de procéder leur était remis. Les patientes reportaient les valeurs des températures sur un site internet sécurisé auquel l'équipe de recherche avait accès. Une biopsie de l'endomètre était ensuite effectuée à la pipelle de Cornier entre le jour 5 et le jour 7 post ovulation, d'environ

300 mg. Cette biopsie était effectuée sans anesthésie et non écho guidée. Si elles le désiraient, les patientes prenaient un antalgique per os 1h avant le geste. Le gynécologue effectuait un prélèvement mycoplasme à l'aide d'un écouvillon vaginal, puis désinfectait le col avant d'effectuer la biopsie. La patiente faisait un test de chlamydia urinaire en fin de geste.

Si le prélèvement mycoplasme revenait positif, le milieu de transport de la biopsie était testé pour le mycoplasme et la patiente et son conjoint étaient traités par antibiotique per os 7 jours selon les recommandations canadiennes. Si le milieu de transport n'était pas infecté, les cellules endométriales de la patiente pouvaient être utilisées pour la co-culture autologue. Il n'y a pas eu de test revenu positif pour le chlamydia.

Si l'on retrouvait une présence de levures sur le prélèvement vaginal, la patiente était traitée en fonction de ses symptômes mais la biopsie pouvait être utilisée pour la co-culture autologue.

Le tissu endométrial était ensuite coupé en petit morceau de 1mm de diamètre au scalpel stérile et lavé deux fois au Washing buffer. Le tissu était ensuite congelé tel quel d'abord progressivement en diminuant la température de 1°C par minute jusqu'à -80°C à l'aide d'un contenant adapté (mr Frosty©) pendant 24h. La biopsie était ensuite transférée dans l'azote liquide à -160°C environ. Le milieu de transport de la biopsie conservé à - 80°C pour analyse bactériologique si nécessaire.

Les patientes commençaient l'estrace© (oestradiol per os) le soir de la biopsie. Soit entre le 19^{ième} jour et le 21^{ième} jour de leur cycle menstruel. Elles étaient ensuite prises en charge par les médecins de la clinique ovo pour commencer leur nouveau

cycle, leur stimulation par gonadotrophines. Les patientes étaient monitorées par échographie (épaisseur de l'endomètre, nombre et taille de follicules) et prise de sang (oestradiol, LH, progestérone) selon les standards de la clinique. Les doses de gonadotrophines étaient adaptées à chaque rencontre en fonction de la réponse de la patiente aux hormones. Quand l'équipe médicale le jugeait, les patientes étaient déclenchées par hcg (5000 UI), pour provoquer l'ovulation avant la ponction qui avait lieu 36h après la prise d'hcg. Le jour du déclenchement de l'ovulation, les patientes étaient randomisées dans le groupe étude (avec co-culture) ou contrôle (embryons sur milieu conventionnel) par tirage au sort. La randomisation avait été faite avant le début de l'étude par informatique.

Si les patientes faisaient partie du groupe étude, la veille de la ponction ovarienne de la participante, les cellules endométriales étaient décongelées et le tapis de cellule élaboré par la technique du laboratoire Gènevrier (France).

Figure 6 Plan méthodologique de l'étude OvoGen

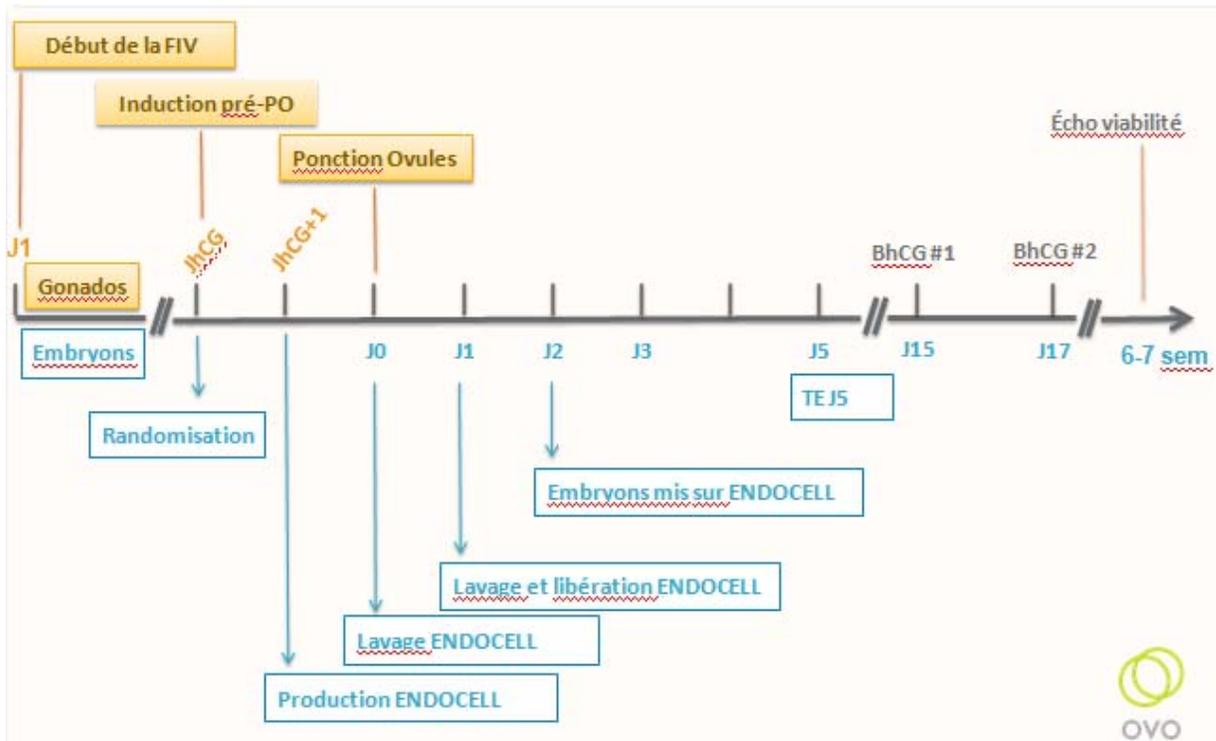


Tableau 1 Description de la population

	moyenne	min	max
age patiente (ans)	32,5	22	38,8
age conjoint (ans)	37,8	29	63
nombre d'embryon par tapis	5,82	2	8

	nombre	pourcentage
protocole court	3	7%
protocole antagoniste	47	94%
Première FIV	23	46%
Deuxième FIV	18	36%
Troisième FIV	6	12%
Quatrième FIV	3	6%
Fécondation par FIV	7	14%
Fécondation par ICSI	38	76%
Fécondation par FIV et ICSI	5	10%

Les cellules subissaient 3 digestions enzymatiques par collagénase et trois filtrations pour séparer les cellules stromales (filtrat) des cellules épithéliales (résidu). La viabilité des cellules stromales était évaluée à l'aide de la coloration au bleu de trypan. Les cellules étaient ensuite comptées etensemencées au taux de 1 glande (regroupement organisé de cellules épithéliales) pour 75 cellules stromales dans les puits avec du milieu de culture. Ce taux était destiné à obtenir finalement 50% de cellules stromales et 50% de cellules épithéliales dans chaque puits. Les plaques de culture cellulaire étaient entreposées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Les

cellules étaient lavées à J1 et J2 (avec PBS et nouveau milieu de culture CCM), et observées au microscope. 3 photos représentatives de chaque puits étaient prises.

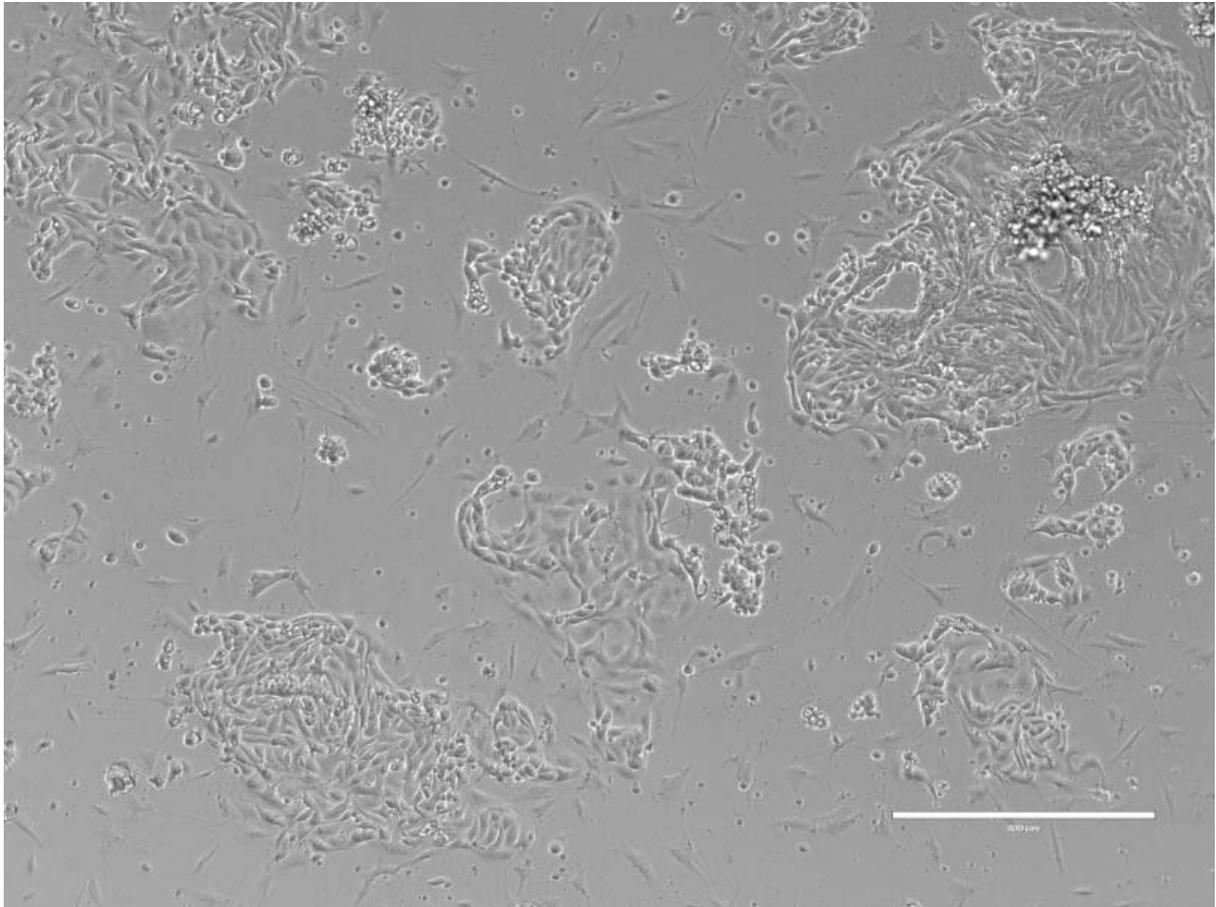


Figure 7 : photo représentative d'un puits au deuxième jour

Les 8 premiers embryons de la patiente du groupe étude ou la totalité des embryons si la patiente en avait moins était mis sur le tapis au matin du 2ieme jour après observation des embryons. Ils étaient laissés en co-culture jusqu'au jour 5 ou 6 puis transferés dans l'utérus ou bien congelés.

Les embryons étaient observés au jour 3, 5 et 6 par les embryologistes selon les procédures de la clinique que les patientes soient dans le groupe contrôle ou étude.

Les embryons étaient classés selon la classification de Gardner et al 1999.(3) En fonction de cette classification, les embryons étaient laissés en culture pour poursuivre leur développement, congelés, transférés ou jetés.

Tableau 2 : Classification des blastocystes selon Gardner et al.

Classification des blastocystes selon Gardner et al

Chiffre correspond au degré d'expansion

1	Blastocyste précoce avec volume du blastocèle inférieur à la moitié du volume de l'embryon
2	Volume du Blastocèle égal ou supérieur à la moitié du volume de l'embryon
3	Blastocyste complet , le blastocèle remplit l'embryon
4	Blastocyste en expansion, le volume du blastocèle est supérieur au volume de l'embryon de base
5	Blastocyste en cours d'éclosion: une partie du trophoctoderme est passée dans la rupture de la zone pellucide
6	Blastocyste complètement éclot

Première lettre correspond à la classification des cellules du bouton embryonnaire

A	Beaucoup de cellules serrées
B	Quelques cellules disparates et regroupées
C	Peu de cellules

Deuxième lettre correspond à la classification des cellules du trophoctoderme

A	Beaucoup de cellules formant un épithélium jointif
B	Quelques cellules formant un épithélium lâche
C	Très peu de larges cellules

Le transfert de blastocyste unique s'effectuait de manière échoguidée à J5 ou J6 de la ponction selon les protocoles de la clinique.

La patiente avait ensuite une analyse sanguine pour détecter le taux de β hcg 14 jours après la ponction ovocytaire. S'il était positif, la patiente avait ensuite une deuxième prise de sang à 48h d'intervalle. Dans une grossesse normale, le taux de β hcg devait doubler en 48h. Le taux de β hcg était considéré positif s'il était supérieur

à 25 UI/L. Si l'évolution était normale, les patientes avaient une échographie de viabilité entre 4 et 6 semaines après la ponction. L'échographie de viabilité était considérée comme positive si l'échographiste décelait un sac gestationnel et un battement cardiaque fœtal.

Les patientes ayant été randomisées dans le groupe contrôle et ayant eu un échec de leur fécondation in vitro sur le cycle de l'essai clinique (absence de grossesse ou fausse couche précoce) pouvait bénéficier d'un tapis hors étude 'offert' jusqu'à un an après la biopsie d'endomètre en cas de nouveau cycle de Fécondation In Vitro à la clinique ovo.

Le protocole, le formulaire de consentement et les différents documents remis aux patientes étaient approuvés par un comité éthique indépendant : ovo ethix.

Dans la sous étude d'OvoGen présentée, nous avons étudié uniquement les patientes randomisées dans le groupe étude et donc les embryons mis sur les tapis de co-culture cellulaire. Selon les recommandations du laboratoire Génévrier pour l'étude OvoGen, les embryons étaient mis en contact avec le tapis si la viabilité des cellules stromales étaient >70%, si la confluence cellulaire était \geq 40% et le taux de cellules épithéliales entre 30% et 90%. Dans l'étude OvoGen, il a été décidé de mettre en contact les tapis et les embryons lorsque les tapis nous paraissaient 'de bonne qualité', même si le taux de cellule épithéliales ou la confluence cellulaire n'était pas dans les normes du laboratoire. C'est-à-dire que nous avons privilégié la qualité des cellules (viabilité) à leur quantité (confluence).

Le but de cette sous-étude est d'évaluer si la qualité des tapis cellulaires (confluence cellulaire, taux de cellules épithéliales, viabilité des cellules stromales) a un impact sur le développement embryonnaire et le taux de grossesse des embryons développés en co-culture.

5. Statistique

5.1. Variables utilisées

Objectif primaire

L'objectif de cette étude est d'étudier le lien entre les différentes composantes de la qualité des tapis cellulaires et la qualité embryonnaire

Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires de cette sous étude sont de comparer la date de la biopsie post ovulation (J5 ou J7) à la qualité des tapis, de comparer la date de la biopsie post ovulation (J5 ou J7) à la qualité embryonnaire, de comparer la date de la biopsie post ovulation (J5 ou J7) au taux de grossesse clinique.

De plus, nous voulions étudier le lien entre les différentes composantes de la qualité des tapis cellulaires et le taux de grossesse clinique.

Les variables d'ajustement sont l'âge de la patiente, l'âge du conjoint, le protocole de FIV antagoniste ou court, le rang de FIV, la fécondation par FIV ou ICSI ou 50% FIV 50% ICSI, le fait que le tapis ait été fait en étude ou hors étude.

5.2. Tests statistiques

Les données ont été analysées en deux groupes distincts : d'une part les 291 embryons répartis sur les 291 puits de tapis cellulaire avec les caractéristiques de chacun pour évaluer la qualité embryonnaire, d'autre part les 50 patientes avec chacune environ 6 embryons mis sur le tapis de co-culture. Seules les 42 patientes ayant eu un transfert ont été analysées pour les taux d'implantation et de grossesse.

Les tests statistiques utilisés étaient des analyses de variance (ANOVA) avec un intervalle de confiance à 95% pour les variables explicatives catégorielles (embryon utile ou non, grossesse ou non), de régression linéaire pour les variables quantitatives (taux de confluence, de cellules épithéliales ou de viabilité des cellules stromales)

Les statistiques ont été faites à l'aide du logiciel SPSS.

6. Résultats

6.1. Analyse descriptive

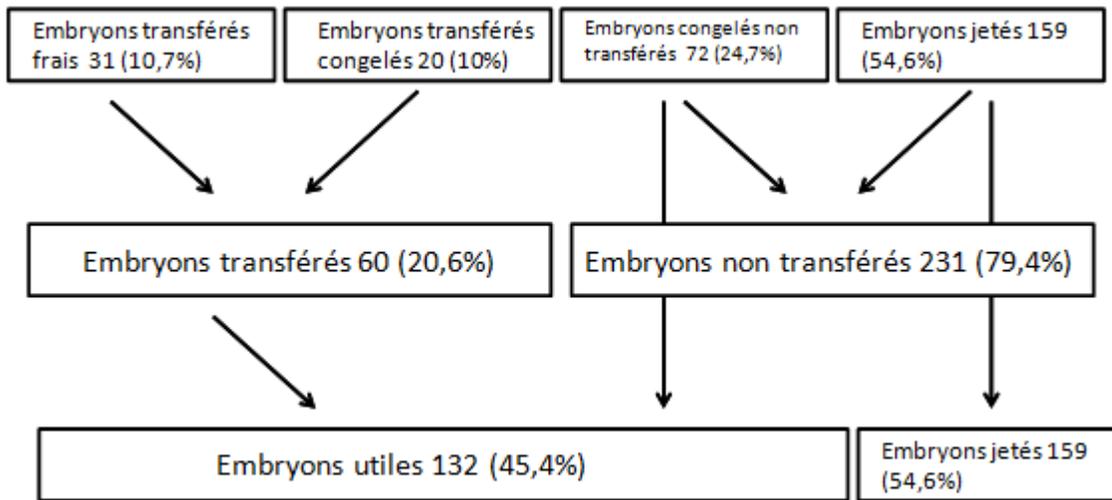
L'étude a permis d'analyser 50 tapis de patientes. 291 puits ont été analysés soit environ 6 puits par patiente. L'âge moyen des patientes était de 32,5 ans (22 à 38,8 ans), l'âge moyen des conjoints était de 37,8 ans (29 à 63 ans). 3 (6%) patientes ont bénéficiés d'un protocole court et 47 d'un protocole antagoniste (94%). Le cycle de FIV étudié était le premier pour 23 patientes (46%), le deuxième pour 18 patientes (36%), le troisième pour 6 patientes (12%) et le quatrième pour 3 patientes (6%). 7 (14%) patientes ont bénéficié d'une fécondation par FIV, 38 (76%) patientes par ICSI et 5 (10%) patientes par moitié FIV moitié ICSI. Le nombre moyen d'embryon mis sur tapis par patiente était de 5,82 (de 2 à 8).

Sur les 50 patientes, 10 (20%) ont bénéficiée d'une biopsie à J5, 12 (24%) d'une biopsie à J6, et 28 (56%) à J7.

Sur les 50 patientes, 42 (84%) ont eu un transfert frais ou congelé et 8 (16%) n'ont pas eu de transfert. Le taux de grossesse moyen des 42 patientes ayant bénéficiées d'un transfert est de 51%.

Sur les 291 embryons étudiés, 31 (10,7%) ont été transférés frais, 29 (10%) ont été transférés après congélation et décongélation, soit 60 embryons transférés, 72 (24,7%) ont été congelés en attente de transfert, soit 132 (45,4%) embryons transférés ou congelés que l'on appelle 'utiles'. 159 embryons (54,6%) ont été jetés. Les embryons ont été jugés utiles par les embryologistes de la clinique selon la classification de Gardner et al vue plus tôt, s'ils avaient atteints le stade de développement leur permettant d'être congelés ou transférés. Les embryons ne remplissant pas ces critères, selon cette même classification, ou présentant un développement anormal, ont été jetés.

Tableau 3 : Devenir des embryons



Sur les 291 puits étudiés, la confluence allait de 15 à 90%, le taux de cellules épithéliales de 15 à 95 % et la viabilité des cellules stromales de 66 à 92%. 39 puits (13,4%) étaient dérogés, selon les critères de Génévrier pour le taux de confluence (c'est-à-dire que le taux de confluence était inférieur à 40%), 5 puits (1,7%) étaient dérogés pour le taux de glande (c'est-à-dire que le taux de glande était inférieur à 30% ou supérieur à 90%.) et 27 puits (9,3%) étaient dérogés pour la viabilité des cellules stromales, (c'est-à-dire que la viabilité était inférieure à 70%).

6.2. Analyse statistique

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre le taux d'embryons utiles ou jetés selon que les puits étaient dérogés ou non des critères du laboratoire Génévrier. Si les puits étaient dérogés pour la confluence, le taux d'embryons utiles n'était pas statistiquement différent du taux d'embryons jetés ($p=0,65$). De même

pour la dérogation pour le taux de cellules glandulaires ($p=0,25$) ou pour la dérogation pour la viabilité des cellules stromales ($p=0,92$).

De la même manière, il n'y avait pas de différence significative de taux de grossesse ($\beta_{hcg}>25$) si les puits étaient dérogués ou non.

Il n'y avait pas de différence significative non plus entre les embryons utiles (transférés ou congelés) et les embryons jetés selon la confluence, le taux de glande, ou la viabilité des cellules stromales ($p=0,58$). Ce résultat ne changeait pas après ajustement des variables âge, rang de FIV, fécondation par FIV ou ICSI ($p=0,64$).

En revanche, il y avait statistiquement un taux de glande plus important si la biopsie était faite à J7 par rapport à J5. ($p=0,004$), un taux de confluence plus important si la biopsie était faite à J7 par rapport à J5 ($p=0,045$), et un taux de cellules stromales viables plus important si la biopsie était faite à J7 par rapport à J5 ($p=0,001$).

De plus, le taux de grossesse augmentait statistiquement avec la diminution de la confluence ($p=0,022$), et avec l'augmentation de la viabilité des cellules stromales ($p=0,001$). Il n'y avait pas de lien retrouvé entre le taux de grossesse et le taux de cellules épithéliales sur les puits.

7. Discussion

Nous avons montré qu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative de la qualité embryonnaire (embryons utiles versus jetés) selon que les embryons étaient déposés sur un puits de cellules déroguées selon les règles de Genévrier (confluence

des cellules <40%, taux de cellules épithéliales <30% ou >90% et viabilité des cellules stromales <70%). Ceci démontre que les critères de qualité des tapis ne sont pas forcément ceux ci. Dans la littérature, très peu d'études sur la co-culture autologue s'intéressent à la qualité des tapis cellulaire ce qui explique que nous ayons peu de chiffres pour déterminer les critères de qualité d'une culture cellulaire endométriale.

En revanche, nous avons montré que la qualité des tapis était directement en lien avec le jour de la biopsie dans le cycle de la patiente : il y avait statistiquement un taux de glande plus important. ($p=0,004$), un taux de confluence plus important ($p=0,045$), et un taux de cellules stromales viables plus important ($p=0,001$) si la biopsie était faite à J7 par rapport à J5. Nous avons donc montré que plus la biopsie était faite tard dans la fenêtre d'implantation, plus le tapis effectué avec cette biopsie était de bonne qualité.

Cette hypothèse a déjà été vérifiée par des études précédentes, dans lesquelles il a été montré que la biopsie utérine devait être faite en phase lutéale (plus de 5 jours après le test LH positif) pour avoir un meilleur taux de grossesse en co-culture (1). De plus, la qualité histologique de l'endomètre a un impact sur le taux de grossesse en co-culture (un endomètre 'retardé' de mauvaise qualité équivalent de moins de J19 du cycle ne montre pas d'amélioration de taux de grossesse en co-culture) (43).

Dans cette perspective, il très pertinent de s'intéresser à une étude en cours actuellement à la Clinique ovo, qui étudie la réceptivité de l'endomètre biopsié grâce à un test sur un panel de gènes et la relation de la réceptivité de l'endomètre avec le taux de grossesse. Il pourrait être très intéressant de relier ce test de réceptivité

endométriale à la co-culture de cellule autologue pour augmenter son efficacité. En effet, comme nous avons démontré que certains endomètres prélevés plus tôt dans le cycle donnaient des tapis de cellules de moins bonne qualité, on pourrait, avec le test de réceptivité, prédire si l'endomètre est apte ou non à donner une bonne co-culture et améliorer le taux de grossesse en fécondation in vitro.

Par ailleurs, nous avons montré que la qualité embryonnaire (embryons utiles versus embryons jetés) n'était pas en corrélation avec le taux de confluence, de cellules épithéliales ou la viabilité des cellules stromales (qualité du tapis cellulaire). Peut être que nous manquons de puissance pour démontrer cela. En effet, le taux de grossesse semble être lié à la confluence du tapis cellulaire et à la viabilité des cellules stromales : le taux de grossesse augmentait statistiquement avec la diminution de la confluence ($p=0,022$), et avec l'augmentation de la viabilité des cellules stromales ($p=0,001$). Il est intéressant de voir que le taux de grossesse n'est pas amélioré par une confluence maximale des cellules endométriales maternelles dans les tapis, alors que dans la plupart des études, le taux de confluence est très important (aux alentours de 90% au moment de mettre les embryons dans les puits.) Il est facile d'expliquer que la confluence cellulaire pourrait nuire au développement embryonnaire et au taux de grossesse.

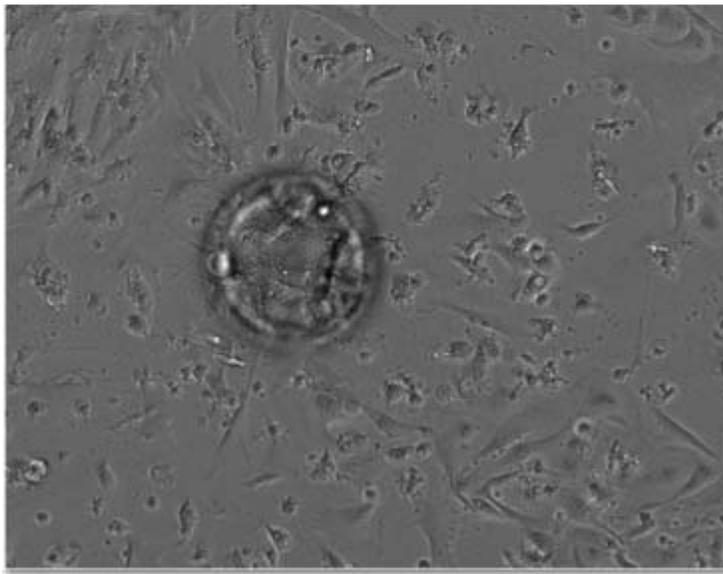
En effet, l'implantation embryonnaire se fait grâce à un dialogue entre l'embryon et l'endomètre maternel. La co-culture améliorerait le développement embryonnaire et le taux d'implantation par des échanges entre les cellules endométriales maternelles et l'embryon : sécrétion de cytokines, facteur de croissance, nutriments... (44)(45) Cela

permettrait de détoxifier le milieu de culture. (46) Les facteurs sécrétés par les cellules pouvant aider l'implantation pourraient être le LIF (leukemia inhibiting factor), retrouvé dans les milieux de co-culture où les embryons se sont le mieux développés(47) ou le GM-CSF (granulocyte macrophage colony) augmenté dans les milieux avec cellules endométriales exposées aux embryons (48). De même, le récepteur à l'Interleukin1 dans l'embryon pourrait faire partie des acteurs de l'implantation s'il est activé par des facteurs sécrétés par l'endomètre maternel (49) (50). Une trop grande confluence de cellules endométriales engendre une nécrose de celles-ci, ceci a été vérifié dans notre étude. Cette nécrose engendre une sécrétion de toxiques et empêche les cellules endométriales de sécréter les facteurs de croissance nécessaires à l'embryon. Il faudrait alors se poser la question de la confluence idéale des tapis de co-culture cellulaire pour le meilleur développement embryonnaire et le meilleur taux d'implantation possible.

Un des points faibles de notre étude est qu'il est plus difficile de qualifier l'embryon pour les embryologistes quand il est sur un tapis de cellules en co-culture autologue. En effet, les cellules du tapis cellulaire gênent la stadification de l'embryon et donc rend plus difficile de le classer en embryon utile (transféré ou congelé) ou jeté, ce qui pourrait expliquer que nous n'ayons pas de résultats significatifs pour le lien entre la qualité des embryons et la qualité du tapis cellulaire alors qu'il en existe pour le taux de grossesse. Ce biais est impossible à éviter car la manipulation de l'embryon permettant de l'observer sans être gêné par le tapis de cellules altérerait le

développement embryonnaire. Néanmoins, toutes les études sur la co-culture comportent le même biais.

Figure 8 Embryon au stade blastocyste en milieu de culture conventionnel (en haut)
et sur co-culture autologue maternelle (en bas)



Dans cette sous étude, des tapis étude (patiente qui avait la co-culture le mois suivant leur biopsie) et hors étude (patiente qui avait la co-culture plusieurs mois après la biopsie, après un échec de fécondation in vitro alors qu'elles avaient été randomisées dans le groupe contrôle) ont été étudiés. Il n'y avait pas de différence entre le taux de grossesse des tapis étude et hors étude. Plusieurs articles ont

montré que les biopsies répétées ou non augmentaient les taux d'implantation en FIV (51) (52) (53) (54). Mais une étude a prouvé qu'il n'y avait pas de différence de taux d'implantation entre transfert les mois après biopsie ou plus tard. (37) (55) La littérature est donc discordante à ce sujet. Dans notre étude, nous n'avons pas montré les bénéfices de la biopsie pour le taux d'implantation.

Finalement, nous savons bien que le développement embryonnaire que nous cherchons à améliorer au maximum avec la co-culture n'est pas le seul facteur d'un bon taux d'implantation et donc d'un bon taux de grossesse. En effet, il faut que l'endomètre soit réceptif de manière optimale au moment du transfert embryonnaire pour favoriser l'implantation. Certaines études ont montré un meilleur résultat de la co-culture sur le don d'ovocyte car l'endomètre est de meilleure qualité quand il n'a pas été stimulé au préalable.(35) De plus, le taux supra physiologique d'oestradiol obtenu après stimulation ovarienne ne semble pas améliorer la qualité de l'endomètre dans de nombreuses études. Ceci nous fait réfléchir sur la préparation de l'endomètre maternel, faut-il ne plus transférer les embryons frais pour avoir un endomètre de meilleure qualité à distance de toute stimulation?

8. Conclusion

En conclusion, dans cette sous étude d'un essai clinique randomisé en double aveugle évaluant le bénéfice sur le développement embryonnaire et le taux de grossesse de la co-culture maternelle autologue versus la culture embryonnaire sur milieu conventionnel, nous cherchions à montrer si la qualité des tapis de cellule endométriale pouvait avoir un impact sur la qualité embryonnaire et le taux de grossesse selon trois critères identifiés dans les différentes études : la confluence cellulaire, le taux de cellules épithéliales et la viabilité des cellules stromales. Nous avons montré qu'il y a une différence de qualité de tapis selon que la biopsie de cellules servant à faire celui-ci est faite cinq jours ou sept jours post ovulation. Nous avons également montré que bien qu'il n'y ait pas de différence de qualité embryonnaire selon la qualité des tapis, le taux de grossesse augmente quand les embryons transférés se sont développés sur des puits de cellules endométriales ayant moins de confluence cellulaire et une meilleure viabilité de cellules stromales. Nous n'avons pas montré de relation entre le taux de grossesse et la quantité de cellules épithéliales sur les puits.

La qualité de tapis cellulaire étant très peu étudiée dans les différents articles sur la co-culture maternelle autologue, il serait intéressant de continuer cette étude sur un plus grand échantillon.

Finalement, il faudrait probablement aussi allier la co-culture à un test de réceptivité endométriale afin de sélectionner éventuellement les meilleurs endomètres pour un meilleur développement embryonnaire et taux d'implantation avec co-culture.

9. Références

1. Spandorfer SD, Barmat LI, Navarro J, Liu H-C, Veeck L, Rosenwaks Z. Importance of the biopsy date in autologous endometrial cocultures for patients with multiple implantation failures. *Fertil Steril*. 2002 Jun;77(6):1209–13.
2. www.embryology.ch. cours d'embryologie.
3. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1999 Jun;11(3):307–11.
4. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*. 2000 Jun;73(6):1155–8.
5. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2011 Jun;26(6):1270–83.
6. Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1998 Jan;13(1):169–77.

7. Chronopoulou E, Harper JC. IVF culture media: past, present and future. *Hum Reprod Update*. 2015 Feb;21(1):39–55.
8. Peng Z-F, Shi S-L, Jin H-X, Yao G-D, Wang E-Y, Yang H-Y, et al. Impact of oxygen concentrations on fertilization, cleavage, implantation, and pregnancy rates of in vitro generated human embryos. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Apr 15;8(4):6179–85.
9. Gomes Sobrinho DB, Oliveira JBA, Petersen CG, Mauri AL, Silva LFI, Massaro FC, et al. IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2011;9:143.
10. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1998 Dec;13(12):3434–40.
11. R.J. Cole, J. Paul. Properties of cultured preimplantation mouse and rabbit and cell strains developed from them. In: *Preimplantation stages of pregnancy*. Little Brown. Boston: G.E.W. Wolstenhouse, M. O'Conner; 1965. p. pp. 82–155.
12. Wiemer KE, Cohen J, Wiker SR, Malter HE, Wright G, Godke RA. Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril*. 1989 Sep;52(3):503–8.
13. Wiemer KE, Hoffman DI, Maxson WS, Eager S, Muhlberger B, Fiore I, et al. Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-

- culture on bovine oviductal epithelial cells. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1993 Jan;8(1):97–101.
14. Tucker MJ, Morton PC, Wright G, Ingargiola PE, Sweitzer CL, Elsner CW, et al. Enhancement of outcome from intracytoplasmic sperm injection: does co-culture or assisted hatching improve implantation rates? *Hum Reprod Oxf Engl.* 1996 Nov;11(11):2434–7.
 15. Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N, Nicollet B. Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1992 Jun;7 Suppl 1:101–6.
 16. Sakkas D, Jaquenoud N, Leppens G, Campana A. Comparison of results after in vitro fertilized human embryos are cultured in routine medium and in coculture on Vero cells: a randomized study. *Fertil Steril.* 1994 Mar;61(3):521–5.
 17. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Fortini D, Fiorentino A, D'Errico A. Human embryo co-culture: results of a randomized prospective study. *Int J Fertil Menopausal Stud.* 1995 Oct;40(5):254–9.
 18. Hu Y, Maxson W, Hoffman D, Ory S, Eager S, Dupre J, et al. Co-culture with assisted hatching of human embryos using Buffalo rat liver cells. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1998 Jan;13(1):165–8.

19. Fong CY, Bongso A. Comparison of human blastulation rates and total cell number in sequential culture media with and without co-culture. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1999 Mar;14(3):774–81.
20. Bongso A, Soon-Chye N, Sathananthan H, Lian NP, Rauff M, Ratnam S. Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1989 Aug;4(6):706–13.
21. Vlad M, Walker D, Kennedy RC. Nuclei number in human embryos co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1996 Aug;11(8):1678–86.
22. Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisinghe R, et al. Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. *Fertil Steril.* 1992 Sep;58(3):569–74.
23. Wetzels AM, Bastiaans BA, Hendriks JC, Goverde HJ, Punt-van der Zalm AP, Verbeet JG, et al. The effects of co-culture with human fibroblasts on human embryo development in vitro and implantation. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1998 May;13(5):1325–30.
24. Carrell DT, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Udoff LC, Cornwell CE, et al. A simplified coculture system using homologous, attached cumulus tissue results in improved human embryo morphology and pregnancy rates during in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.* 1999 Aug;16(7):344–9.

25. Fukaya T, Chida S, Murakami T, Yajima A. Is direct cell-to-cell contact needed to improve embryonic development in co-culture? *Tohoku J Exp Med.* 1996 Nov;180(3):225–32.
26. Benkhalifa M, Demiroglu A, Sari T, Balashova E, Tsouroufaki M, Giakoumakis Y, et al. Autologous embryo-cumulus cells co-culture and blastocyst transfer in repeated implantation failures: a collaborative prospective randomized study. *Zygote Camb Engl.* 2012 May;20(2):173–80.
27. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Cecconi S, Nottola SA, et al. Human embryo development and pregnancies in an homologous granulosa cell coculture system. *J Assist Reprod Genet.* 2000 Jan;17(1):1–12.
28. Dirnfeld M, Goldman S, Gonen Y, Koifman M, Calderon I, Abramovici H. A simplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: a controlled study. *Fertil Steril.* 1997 Jan;67(1):120–2.
29. Ben-Chetrit A, Jurisicova A, Casper RF. Coculture with ovarian cancer cell enhances human blastocyst formation in vitro. *Fertil Steril.* 1996 Mar;65(3):664–6.
30. Kattal N, Cohen J, Barmat LI. Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2008 Oct;90(4):1069–76.
31. Mercader A, Garcia-Velasco JA, Escudero E, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of

human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. *Fertil Steril*. 2003 Nov;80(5):1162–8.

32. Jayot S, Parneix I, Verdaguer S, Discamps G, Audebert A, Emperaire JC. Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. *Fertil Steril*. 1995 Jan;63(1):109–14.
33. Nieto FS, Watkins WB, Lopata A, Baker HW, Edgar DH. The effects of coculture with autologous cryopreserved endometrial cells on human in vitro fertilization and early embryo morphology: a randomized study. *J Assist Reprod Genet*. 1996 May;13(5):386–9.
34. Barmat LI, Liu HC, Spandorfer SD, Xu K, Veeck L, Damario MA, et al. Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium. *Fertil Steril*. 1998 Dec;70(6):1109–13.
35. Simón C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohí J, et al. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Aug;84(8):2638–46.
36. Spandorfer SD, Pascal P, Parks J, Clark R, Veeck L, Davis OK, et al. Autologous endometrial coculture in patients with IVF failure: outcome of the first 1,030 cases. *J Reprod Med*. 2004 Jun;49(6):463–7.

37. Eyheremendy V, Raffo FGE, Papayannis M, Barnes J, Granados C, Blaquier J. Beneficial effect of autologous endometrial cell coculture in patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril*. 2010 Feb;93(3):769–73.
38. Barmat LI, Liu HC, Spandorfer SD, Kowalik A, Mele C, Xu K, et al. Autologous endometrial co-culture in patients with repeated failures of implantation after in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet*. 1999 Mar;16(3):121–7.
39. Spandorfer SD, Barmat L, Navarro J, Burmeister L, Veeck L, Clarke R, et al. Autologous endometrial coculture in patients with a previous history of poor quality embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2002 Jul;19(7):309–12.
40. Rubio C, Simón C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Remohí J, Pellicer A. Clinical experience employing co-culture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2000 Dec;15 Suppl 6:31–8.
41. Seta M. Embryo transfer after autologous endometrial coculture improves pregnancy rates. *Hum Cell*. 2001 Jun;14(2):135–40.
42. Desai N, Abdelhafez F, Bedaiwy MA, Goldfarb J. Live births in poor prognosis IVF patients using a novel non-contact human endometrial co-culture system. *Reprod Biomed Online*. 2008 Jun;16(6):869–74.
43. Spandorfer SD, Soslow R, Clark R, Fasouliotis S, Davis OK, Rosenwaks Z. Histologic characteristics of the endometrium predicts success when utilizing

- autologous endometrial coculture in patients with IVF failure. *J Assist Reprod Genet.* 2006 Apr;23(4):185–9.
44. Barmat LI, WorriLOW KC, Paynton BV. Growth factor expression by human oviduct and buffalo rat liver coculture cells. *Fertil Steril.* 1997 Apr;67(4):775–9.
45. Pampfer S, Arceci RJ, Pollard JW. Role of colony stimulating factor-1 (CSF-1) and other lympho-hematopoietic growth factors in mouse pre-implantation development. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* 1991 Oct;13(10):535–40.
46. Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR. Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil.* 1991 May;92(1):125–31.
47. Spandorfer SD, Navarro J, Levy D, Black AR, Liu HC, Veeck L, et al. Autologous endometrial coculture in patients with in vitro-fertilization (IVF) failure: correlations of outcome with leukemia inhibiting factor (LIF) production. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989. 2001 Dec;46(6):375–80.
48. Spandorfer SD, Barmat LI, Liu HC, Mele C, Veeck L, Rosenwaks Z. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor production by autologous endometrial co-culture is associated with outcome for in vitro fertilization patients with a history of multiple implantation failures. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989. 1998 Nov;40(5):377–81.

49. De los Santos MJ, Mercader A, Francés A, Portolés E, Remohí J, Pellicer A, et al. Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development. *Biol Reprod.* 1996 Mar;54(3):563–74.
50. Simón C, Gimeno MJ, Mercader A, O'Connor JE, Remohí J, Polan ML, et al. Embryonic regulation of integrins beta 3, alpha 4, and alpha 1 in human endometrial epithelial cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Aug;82(8):2607–16.
51. Zhou L, Li R, Wang R, Huang H, Zhong K. Local injury to the endometrium in controlled ovarian hyperstimulation cycles improves implantation rates. *Fertil Steril.* 2008 May;89(5):1166–76.
52. Raziel A, Schachter M, Strassburger D, Bern O, Ron-El R, Friedler S. Favorable influence of local injury to the endometrium in intracytoplasmic sperm injection patients with high-order implantation failure. *Fertil Steril.* 2007 Jan;87(1):198–201.
53. Barash A, Dekel N, Fieldust S, Segal I, Schechtman E, Granot I. Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2003 Jun;79(6):1317–22.
54. Gnainsky Y, Granot I, Aldo PB, Barash A, Or Y, Schechtman E, et al. Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. *Fertil Steril.* 2010 Nov;94(6):2030–6.

55. Melnick AP, Murphy EM, Masbou AK, Sapro KJ, Rosenwaks Z, Spandorfer SD. Autologous endometrial coculture biopsy: is timing everything? Fertil Steril. 2015 May 16;
-

Curriculum vitae

Interne en quatrième année DES Gynéco-
obstétrique

Formation :

Juin 2004	Baccalauréat Scientifique spécialité Mathématiques mention Bien
Juin 2006	Master 1 scientifique faculté de saint quentin en yvelines
Mai 2010	Epreuve Nationale Classante 682 ^{ème} sur 7233 candidats
Semestre 1	
Semestre 2	Gynécologie Pr raudrant- Lyon sud
Semestre 3	Obstétrique Pr raudrant - Lyon Sud
Semestre 4	Obstétrique Pr gaucherand - HFME
Semestre 5	Procréation Médicalement assistée Pr Salle- HFME
Semestre 6	Chirurgie Viscérale dr Frecon- saint Luc saint Joseph
Semestre 7	Obstétrique Pr Rudigoz-Coix Rousse Diagnostic anté-natal Pr Rudigoz- Croix Rousse
Année 2011	Diplôme Inter Universitaire Ménopause - faculté Paris Descartes
Année 2012	
Année 2014	Diplôme Inter Universitaire Colposcopie et pathologie cervicale - faculté Lyon 1

Année 2014-
2015 Diplôme Inter Universitaire Echographie gynécologie
/obstétrique-faculté Lyon 1

20 avril 2015 Maîtrise en sciences biomédicales à l'université de Montréal,
option recherche clinique

Formation en Histoire de l'éthique de la recherche et Bonnes
Pratiques Cliniques

Langue

Anglais : courant

Allemand : scolaire

Informatique Maîtrise du **Pack Office**

Permis de conduire B

Expériences professionnelles :

Été 2006 Garde d'aide soignante à L'hôpital Foch (Suresnes)

Septembre 2006 Stage de 1 mois en Anatomopathologie dans le cadre du master 1-
Hôpital Ambroise-Paré (Boulogne Billancourt)

Année 2012-
2013-2014 Remplacement en cabinet (centre Bayard) de gynécologie médicale

Année 2011 Communication orale sur la méningoencéphalite du post partum,
étude d'un cas, réunion interrégionale

Année 2012	Communication orale sur le syndrome des ovaires polykystiques, risque et fertilité, réunion interrégionale
Année 2013	Communication orale sur le vaccin contre l'HPV (human papilloma virus), réunion inter régionale
Année 2013	Laparoscopic promontofixation: defining early morbidity using a standardized method publié dans <u>Gynecol Obstet Fertil.</u> 2014 Jun;42(6):378-82. <u>Golfier F</u> ¹ , <u>Sesques A</u> ² , <u>Benayoun D</u> ² , <u>Krauth JS</u> ² , <u>Lunel Potencier A</u> ² , <u>Benchaib M</u> ² , <u>Raudrant D</u> ² .
Année 2014-2015	Assistante de recherche clinique au département Recherche et Développement de la clinique ovo comme stade de recherche clinique dans le cadre de la maîtrise à l'université de Montréal
04 novembre 2014	Responsable de la formation de gynécologie obstétrique et fertilité pour l'équipe de recherche et développement de la clinique ovo

Réalisations personnelles

Eté 2006	Action Humanitaire en Roumanie 3 semaines <i>Aide pour enfants des rues et construction d'un village</i>
Eté 2007	Action humanitaire en Mauritanie 1 mois <i>Aide et matériel apporté à l'hôpital de Maghama à la frontière avec le Senegal</i>

Centres d'intérêt :

Responsabilité dans une maîtrise scout

Sport : - Course

- Ski

Musique : chant, violoncelle. *12 ans d'études au Conservatoire National et Régional de Versailles, participations aux concerts annuels*