

Critères de sélection des embryons en fécondation in vitro

Embryo selection criteria in in vitro fertilization

●● M. Dumont*

POURQUOI TOUJOURS MIEUX ÉVALUER LA QUALITÉ EMBRYONNAIRE ?

Depuis quelques années, les équipes médicales, responsables de la fécondation in vitro, ont diminué le nombre d'embryons replacés dans le but évident d'éviter les grossesses multiples. Certains pays européens ont émis des recommandations pour transférer le plus souvent un maximum de deux embryons : la France (*Guide des bonnes pratiques cliniques et biologiques*), le Royaume-Uni (*Human fertilization and embryology authority*). D'autres ont adopté, de façon législative, le transfert d'un seul embryon (Suède, Belgique). D'autres encore n'autorisent la culture que de deux ou trois zygotes avec congélation éventuelle des zygotes surnuméraires (Allemagne, Suisse, Autriche, Italie).

Le taux de grossesses multiples de haut rang a baissé (association FIVNAT [1] 2001 : 1,5%). Cependant, il reste des efforts à faire pour réduire le pourcentage d'accouchements de jumeaux, qui est encore de 24,1% à 26,2% d'après le bilan FIVNAT 2001, et qui concerne essentiellement les femmes jeunes (moins de 35 ans). Pour ce faire, le biologiste doit trouver des critères morphologiques microscopiques simples, non invasifs, faciles à utiliser en routine. Des observations quotidiennes doivent permettre de mieux choisir le ou les embryons au plus fort potentiel évolutif sans compromettre les chances de grossesse des patientes.

Le jour zéro (J0) étant le jour de l'obtention et de la mise en contact des gamètes (ovocytes et spermatozoïdes) du couple, nous allons décrire les critères biologiques actuellement utilisés dès le stade de fécondation observé au jour 1 (J1), à savoir :

- évaluation des zygotes à J1 ;
- première division embryonnaire à J1 ;
- morphologie des embryons au jour 2 (J2) ou au jour 3 (J3) ;
- obtention et morphologie du blastocyste au jour 5 (J5).

ÉVALUATION DES ZYGOTES

Le stade de fécondation appelé stade zygote (*figures 1, 2, 3*) se caractérise par la présence de deux noyaux appelés pronuclei (PN) et deux globules polaires. Une présélection des embryons peut être faite à J1 sur la morphologie des pronuclei, suivie du



Figure 1. Nucléoles (N) polarisés dans la zone d'accolement des PN.

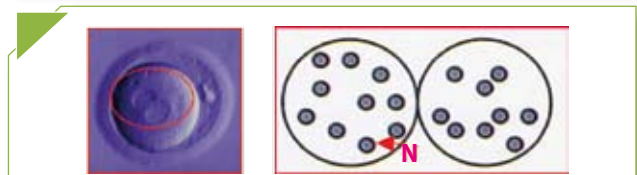


Figure 2. Nucléoles (N) répartis de façon homogène dans les PN.

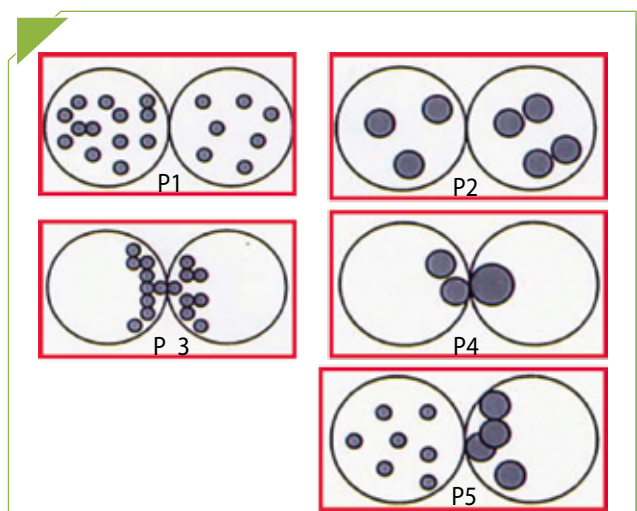


Figure 3. Les autres profils de zygotes.

choix des plus beaux embryons parmi les zygotes sélectionnés. Dix-sept à vingt heures après l'insémination des ovocytes, il est habituel d'observer :

- La migration des deux pronuclei (2 PN) au centre de l'œuf, ce qui reflète un bon fonctionnement du centriole (organite fourni

* Centre FIV Pierre-Cherest, 5, rue Pierre-Cherest, 92200 Neuilly-sur-Seine. Laboratoire d'Eylau, 55, rue Saint-Didier, 75116 Paris.

par le spermatozoïde), nécessaire à la formation du fuseau de microtubules, donc à la division cellulaire.

► La taille des pronuclei : une trop grande différence de taille des 2 PN est associée à des anomalies chromosomiques telles que des aneuploïdies.

Il semble également important d'examiner le nombre, la taille et la répartition des nucléoles dans les PN. Le nucléole se forme à partir d'une région bien définie du chromosome, appelée organisateur nucléolaire. C'est le lieu de synthèse des ARN ribosomiques, qui constituent 65% des ribosomes, ces derniers étant des "usines" à protéines. Les précurseurs de nucléoles fusionnent pour devenir plus gros. Le volume des nucléoles et, dans certains cas, leur nombre élevé traduisent une activité cellulaire intense.

Les zygotes peuvent être classés en six catégories : P0, P1, P2, P3, P4 et P5 (2). Les profils P0 correspondent à des pronuclei synchrones : le nombre de nucléoles dans chaque PN doit être supérieur ou égal à 3. La différence de nombre entre les 2 PN doit être inférieure à 3 ; s'il y en a moins de 7, ils doivent être polarisés dans la zone d'accolement des PN, s'il y en a plus de 7, ils doivent être non polarisés.

Autre classification des pronuclei (3) (figures 4, 5, 6)

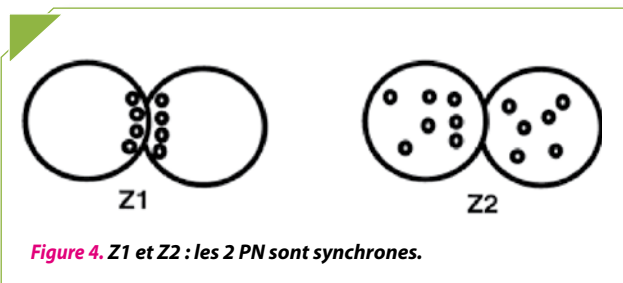


Figure 4. Z1 et Z2 : les 2 PN sont synchrones.

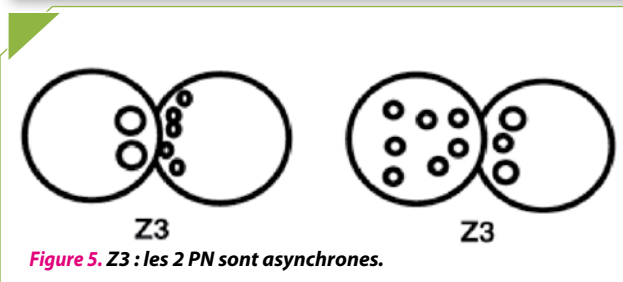
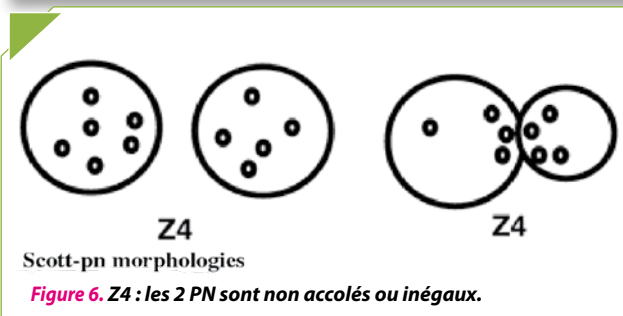


Figure 5. Z3 : les 2 PN sont asynchrones.



Scott-pn morphologies

Figure 6. Z4 : les 2 PN sont non accolés ou inégaux.

La synchronie de développement des deux pronuclei semble être associée à une meilleure capacité d'implantation des embryons. Les taux de grossesse obtenus avec les transferts d'embryons "P0" (44,9% et 42,2%) ainsi que les taux d'implantation (30,2% et 25,8%) sont significativement supérieurs à ceux obtenus avec les transferts d'embryons "non P0" (taux de grossesses : 22,1% et 19,7% ; taux d'implantation : 11,2% et 11,8%). En outre, plus il y a d'embryons "P0" au transfert, plus le nombre de grossesses multiples augmente. Inversement, plus il y a d'embryons "non P0" au transfert, moins il y a de grossesses et donc de grossesses multiples (2, 4).

Les zygotes Z1 et Z2 produisent 49,5% de blastocystes in vitro contre 28% pour les autres types de zygotes. De plus, la présélection des zygotes à J1, associée à la morphologie embryonnaire soit à J3, soit à J5, permet d'obtenir des taux d'implantation et de grossesses supérieurs à ceux que l'on obtient si l'on ne tient compte que de la morphologie des embryons (J3 : taux de grossesses : 57% contre 31% ; taux d'implantation : 33% contre 19% ; J5 : taux de grossesses : 73% contre 58% ; taux d'implantation : 52% contre 39%) (3, 5).

Pour d'autres équipes, il n'a pas été trouvé de différences significatives entre les taux de grossesse et d'implantation obtenus avec les bons embryons provenant respectivement des "P0" et des "non P0". Cependant, la polarisation d'au moins un PN serait un bon critère de développement embryonnaire (6-8).

Les zygotes "P0" ou Z1 et Z2 doivent donc être choisis en priorité pour le transfert si les embryons correspondants ont une bonne morphologie. De plus, ces zygotes ont plus de chances de donner des embryons génétiquement normaux (9).

La présence d'une zone claire dans le cortex de l'œuf et un "halo cytoplasmique" autour des PN, correspondant à une concentration d'organites, principalement des mitochondries, seraient également des signes de bon développement embryonnaire (10).

La sélection au stade 2 PN est importante pour les équipes qui doivent impérativement ne garder que deux ou trois zygotes en culture et congeler les autres.

PREMIÈRE DIVISION DE L'EMBRYON À J1

Historiquement et pour des raisons d'organisation, les embryons ont toujours été regardés le matin de J2 ou J3 avant le transfert. Une bonne cinétique de division embryonnaire se caractérise par l'obtention de 4 cellules à J2 et 8 cellules à J3. Dès l'après-midi de J1, on peut observer la première division embryonnaire : deux cellules (11). Parmi les zygotes, 25 à 27 heures post-insémination, les trois principaux stades présents sont le stade 2 PN, le stade avec disparition des PN, appelé syngamie, et le stade 2 cellules. Les embryons déjà divisés à J1 donnent des taux de grossesses et d'implantation beaucoup plus élevés que ceux qui se divisent plus tardivement. Ils donnent le plus fort taux de beaux embryons à J2 et de blastocystes à J7 (12). La division précoce des embryons, 25 à 27-29 heures post-insémination, est donc un bon indicateur biologique du potentiel évolutif des embryons.

En associant la polarisation des PN avec la division précoce des embryons à J1, le taux de grossesse des embryons à PN polarisés et/ou de division précoce était de 51 % contre 38 % pour les embryons qui n'avaient pas ces critères (13). Le pourcentage de deux cellules observées 25-27 heures après insémination en ICSI est plus élevé que celui de FIV : 30 % contre 24 % (14). Il semble préférable d'observer la division précoce des embryons d'ICSI à 26 heures et celle des embryons de FIV 2 heures plus tard.

MORPHOLOGIE DES EMBRYONS À J2 OU J3

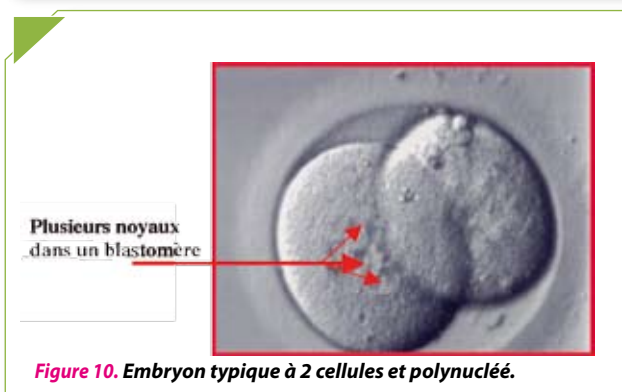
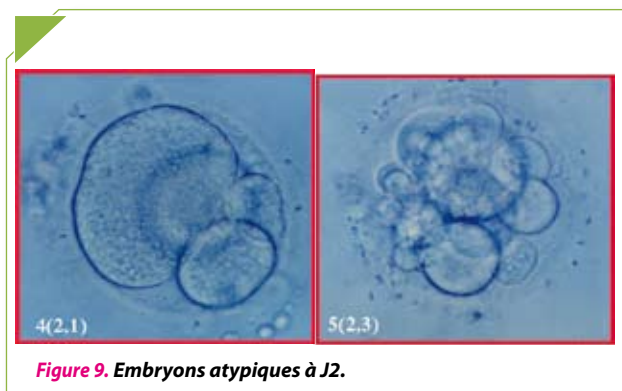
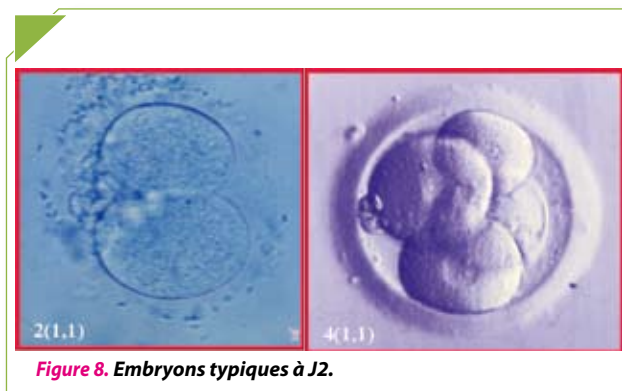
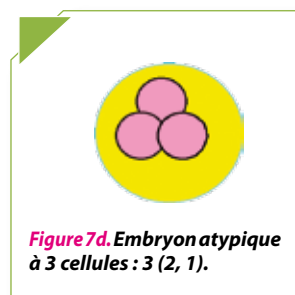
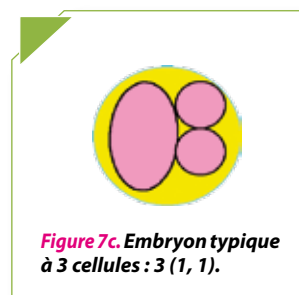
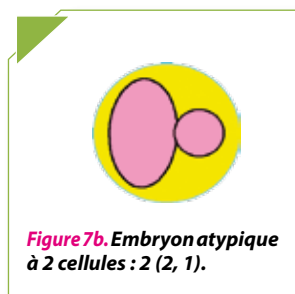
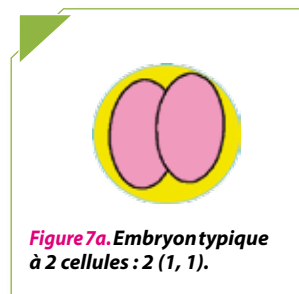
Environ 24 heures après l'observation des pronuclei, on note le stade de division des embryons. Ce jour est le plus souvent celui du transfert.

La classification assez simple, décrite ci-après, a été discutée au sein de l'association des BLEFCO (Biologistes des laboratoires d'études de la fécondation et de la conservation de l'œuf).

L'aspect embryonnaire est noté n (x, y), ce qui permet de préciser le nombre de cellules embryonnaires, leur "taille" ainsi que le pourcentage de fragments.

- n = nombre de cellules de l'embryon ;
- x = 1 si les blastomères sont typiques ; 2 si les blastomères sont atypiques ;
- y = 1 quand il y a moins de 10 % de fragments ; 2 quand le taux de fragments est entre 10 % et 50 % ; 3 quand le taux de fragments est supérieur à 50 %.

Exemple d'embryons n (x, y) (figures 7a à d)



On choisit en priorité (figures 8, 9 et 10)

- ▶ Les embryons dits "typiques", pour lesquels le nombre et la taille des cellules pour un stade donné correspondent à ce que l'on attend lors d'une division "normale". Si tel n'est pas le cas, les embryons sont dits "atypiques". À J2, on choisira l'embryon typique à 4 cellules et à J3 l'embryon typique à 8 cellules.
- ▶ Les embryons qui n'ont pas ou peu de fragments, car le volume des blastomères décroît significativement avec le degré de fragmentation (15). De plus, les fragments ont un impact négatif sur la formation de blastocystes normaux.
- ▶ Les embryons sans blastomères polynucléés, car ces derniers

témoignent de leur viabilité réduite (16). En effet, les embryons polynucléés ont plus d'anomalies chromosomiques et produisent moins de blastocystes normaux.

La caractérisation de l'embryon précoce à bon potentiel implantatoire est une étape indispensable si l'on veut diminuer le nombre d'embryons transférés ou ne remettre qu'un seul embryon le plus souvent possible. Plusieurs études ont montré que la qualité embryonnaire était corrélée au taux de grossesse. Deux paramètres sont importants : la vitesse de division et le taux de fragments des embryons.

À partir d'une étude rétrospective, Van Royen et al. (17) ont défini les caractéristiques des embryons qui ont 100 % d'implantation (15). Ces embryons, qualifiés de "top quality embryo", ou "embryon de qualité optimale", ont :

- 4 à 5 cellules à J2 ;
- ≥ 7 cellules à J3 ;
- moins de 20 % de fragments ;
- pas de blastomères polynucléés.

Sur 221 transferts, chez des femmes de moins de 38 ans, de deux embryons à J3, il a pu être remplacé au moins un embryon "top" dans 75 % des cas. Si deux embryons "top" sont remplacés, il y a 67 % de grossesses évolutives mais 57 % de grossesses gémellaires. Si on transfère un embryon "top" et un embryon "non top", le taux de grossesse reste élevé : 58 %, et le taux de jumeaux est diminué : 21 %. En revanche, s'il n'y a aucun embryon "top" à transférer, le taux de grossesse chute à 23 % et il n'y a pas de jumeaux. Cette analyse montre qu'il est possible, chez des patientes jeunes, d'obtenir un taux de grossesse très acceptable avec un seul embryon, en évitant les jumeaux, lorsqu'il y a au moins un embryon "top" dans la cohorte embryonnaire. Cela a été confirmé par l'étude prospective randomisée de Gerris et al. (18), dans laquelle le transfert d'un embryon "top" donne 38,5 % de grossesses évolutives avec une seule gémellaire, contre 74 % de grossesses et 30 % de jumeaux avec le transfert de deux embryons "top".

Le transfert électif d'un embryon (74 transferts), chez des femmes qui en avaient deux de bonne qualité disponibles, donnait un taux de grossesse comparable à celui des 742 transferts de deux embryons (29,7 % contre 29,4 %) en évitant les grossesses multiples. De plus, dans ce groupe, le taux cumulé des résultats des transferts d'embryons frais et congelés était de 47,3 % (19).

Une étude multicentrique prospective randomisée afin de comparer le transfert d'un ou deux embryons chez des patientes sélectionnées (moins de 36 ans, premier cycle de FIV, au moins quatre embryons de bonne qualité) a montré que le taux de grossesse est plus faible lorsqu'un seul embryon est transféré (32,4 % contre 47,1 % pour deux embryons transférés). Cependant, les transferts d'embryons congelés permettent de restaurer un très bon taux de grossesse : 47,3 %, en évitant les grossesses gémellaires, dont le taux est de 39 % dans le groupe de deux embryons (20).

Le transfert électif d'un seul embryon n'est envisageable que si le couple a au moins un embryon surnuméraire de bonne qualité à congeler et si le laboratoire a un bon programme de congélation et décongélation des embryons.

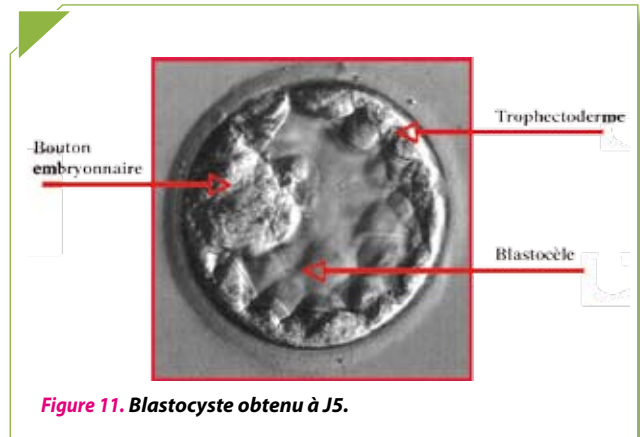


Figure 11. Blastocyste obtenu à J5.

OBTENTION ET MORPHOLOGIE DU BLASTOCYTE

Pour mieux sélectionner les embryons, nous avons la possibilité de les cultiver pendant 5 à 6 jours jusqu'au stade blastocyste (figure 11). L'utilisation des milieux séquentiels permet désormais d'envisager la culture prolongée des embryons, en routine, notamment pour les femmes jeunes ayant beaucoup d'embryons, dans le but de ne transférer qu'un seul blastocyste. L'aspect embryonnaire étant différent d'un blastocyste à l'autre, il est nécessaire de définir les critères morphologiques du blastocyste qui a le meilleur potentiel implantatoire.

Afin de caractériser avec précision le blastocyste à J5, un score alphanumérique lui est attribué. Chacune des trois parties de l'embryon est codifiée :

- ▶ Le blastocyste est noté par un chiffre de 1 à 6, selon le volume de son blastocèle et son stade de développement.
- ▶ Le bouton embryonnaire est caractérisé par une lettre : A, B ou C, selon le nombre et l'aspect de ses cellules. Il est noté A s'il est compact, composé de nombreuses cellules et bien individualisé. S'il est moins organisé avec moins de cellules, il est noté B. Enfin, s'il est peu visible et formé de peu de cellules, il est noté C.
- ▶ Le trophoctoderme est lui aussi caractérisé par une lettre : A, B ou C, selon le nombre et l'aspect de ses cellules. Il est noté A si les cellules forment un épithélium festonné, B si l'épithélium est irrégulier, C si l'épithélium est lisse.

La lettre A correspond à la meilleure morphologie cellulaire. Gardner et al. (21) ont défini le score embryonnaire au stade blastocyste qui donnait le plus fort taux de grossesses et d'implantation : c'est le score ≥ 3 AA qui désigne le "top quality blastocyst" ou blastocyste de qualité optimale.

Sur 107 transferts de deux blastocystes chez des femmes très sélectionnées (moins de 45 ans, FSH de base normale à J3, un utérus normal, et au moins 10 follicules de taille supérieure ou égale à 12 mm le jour de l'HCG), les transferts de deux blastocystes de qualité optimale donnent 86,8 % de grossesses et 61 % de jumeaux, alors que les transferts de deux blastocystes

de qualité non optimale donnent deux fois moins de grossesses (43,8 %) et deux fois moins de jumeaux (28,6 %).

Cependant, on constate que même s'il n'y a pas de "top blastocyst" au transfert, le taux de jumeaux est encore très élevé. Il serait donc souhaitable de ne transférer qu'un seul blastocyste pour éviter les grossesses gémellaires chez des patientes sélectionnées.

Le transfert d'un seul blastocyste semble répondre au problème des grossesses multiples (22). Cependant, les patients doivent être informés du risque estimé jusqu'à 5 % d'avoir des jumeaux monozygotes. De plus, bien que relativement performante, la culture prolongée a ses facteurs limitants : les conditions de culture ne sont pas parfaites, même si des progrès ont été faits, et la congélation des blastocystes surnuméraires doit encore être améliorée.

CONCLUSION

Les facteurs prédictifs de bon développement embryonnaire sont :

- la polarisation des PN ;
- la présence d'un "halo cytoplasmique" autour des PN ;
- la division précoce des embryons 25 à 27-29 heures post-insémination ;
- la bonne morphologie embryonnaire à J2 (4 cellules), J3 (8 cellules) ou J5 (blastocyste).

L'optimisation de la sélection des embryons à transférer exige une bonne expérience pratique de laboratoire et un système de culture fiable. Chaque biologiste doit définir les observations indispensables pour un meilleur choix des embryons dans ses propres conditions de culture, puisque celles-ci influent sur la vitesse de développement des embryons. Par l'association d'observations simples et efficaces notées à des temps très précis pendant la culture des gamètes et des embryons, il est possible de proposer un score global du développement embryonnaire ayant une meilleure valeur prédictive de la grossesse que la simple observation de la morphologie des embryons le jour du transfert. L'ensemble de ces informations permet à l'équipe clinico-biologique de décider au mieux du nombre d'embryons à transférer, en tenant compte de l'âge et du dossier clinique de la patiente.

Le développement récent de logiciels d'images (15) avec la mémorisation de nos observations quotidiennes des gamètes et des embryons permet de mieux repérer la combinaison ovocyte-spermatozoïde susceptible de produire l'embryon évolutif qui donnera le bébé. ■

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. FIVNAT 2001:site internet:<http://perso.wanadoo.fr/fivnat.fr>.
2. Tesarik J, Junca AM, Hazout A et al. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum Reprod* 2000;15(6):1396-9.
3. Scott L, Alvero R, Leondires M et al. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000;15(11):2394-403.
4. Wittemer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J et al. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod* 2000;15(12):2591-7.
5. Lan KC, Huang FJ, Lin YC et al. The predictive value of using a combined Z-score and day 3 embryo morphology score in the assessment of embryo survival on day 5. *Hum Reprod* 2003;18(6):1299-1306.
6. Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod* 2001;16(10):2177-81.
7. Payne JF, Raburn DJ, Couchman JM et al. Relation ship between pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) and standard day 2 or 3 embryo morphology with regard to assisted reproductive techniques outcome. *Fertil Steril* 2005;84(4):900-9.
8. James AN, Hennessy S, Reggio B et al. The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. *Hum Reprod* 2006;21(6):1599-604.
9. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP et al. Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. *Hum Reprod* 2007;22(1):241-9.
10. Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Mathews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997;12:532-41.
11. Sakkas D, Percival G, D'arcy Y et al. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril* 2001;76(6):1150-6.
12. Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP et al. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 2002;17(2):407-12.
13. Lundqvist M, Johansson U, Lundkvist O et al. Does pronuclear morphology and/or early cleavage rate predict embryo implantation potential? *Reprod Biomed Online* 2000;2(1):12-6.
14. Warf E, Dimitrakopoulos A, Khalaf Y et al. Early embryo development is an indicator of implantation potential. *Reprod Biomed Online* 2004;8(2):212-8.
15. Hnida C, Engenheiro E, Ziebe S. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as a biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Hum Reprod* 2004;19(2):288-93.
16. Boiso I, Veiga A, Edwards RG. Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer. *Reprod Biomed Online* 2002;5(3):328-50.
17. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999;14(9):2345-9.
18. Gerris J, De Neubourg D, Mangelschots K et al. Prevention of twen pregnancy after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomised clinical trial. *Hum Reprod* 1999;14(10):2581-7.
19. Vilksa S, Tiitinen A, Hyden-Granskog C et al. Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth. *Hum Reprod* 1999;14(9):2392-5.
20. Martikainen H, Tiitinen A, Tomas C et al. One versus two embryo transfer after IVF and ICSI: a randomised study. *Hum Reprod* 2001;16(9):1900-3.
21. Gardner DK et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000;73(6):1155-8.
22. Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM et al. In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *N Engl J Med* 2006;354(11):1139-46.