

UNIVERSITE TOULOUSE III – Paul SABATIER
FACULTE DE MEDECINE

Année 2013

2013 TOU3-1702

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE
SPECIALITE BIOLOGIE MEDICALE

Présentée et soutenue publiquement le **25 Octobre 2013** par

Camille RABINEL

DETECTION DU BISPHENOL A DANS LES MILIEUX DE
CULTURE EMBRYONNAIRE UTILISES EN ROUTINE CHEZ
L'HOMME.

Directeur de thèse : **Docteur Roger LEANDRI.**

JURY :

Monsieur le Professeur **Louis BUJAN**
Madame le Professeur **Véronique GAYRARD**
Monsieur le Professeur **Daniel CUSSAC**
Monsieur le Docteur **Roger LEANDRI**
Monsieur le Professeur **Jean PARINAUD**

Président du jury
Assesseur
Assesseur
Assesseur
Assesseur

REMERCIEMENTS...

AUX MEMBRES DU JURY,

A monsieur le professeur Louis Bujan,

Merci d'avoir accepté d'être le président du jury pour ma thèse. J'ai beaucoup appris à vos côtés, que ce soit de l'andrologie, de la spermiologie, de l'éthique ou de la voile. J'espère bien mettre la plus part de ces connaissances en pratique.

Soyez assuré de mon immense reconnaissance.

A monsieur le professeur Daniel Cussac,

Merci d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse, et ceci au pied levé!

Soyez assuré de mon entière reconnaissance.

A madame le professeur Véronique Gayraud,

Merci de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire de l'école vétérinaire et de m'y avoir si bien accueillie. Déjà membre du jury de mon mémoire de master 1 de biologie de la reproduction (sujet : Traitement par des agonistes de la GnRH chez les chattes, les chiennes et les coyotes), je vous remercie de prendre, une fois de plus, part à l'évaluation de mon travail.

Soyez assuré de ma très grande reconnaissance.

A monsieur le professeur Jean Parinaud,

Je vous remercie de m'avoir si bien accueillie dans votre service. Merci pour tous ce que vous m'avez appris, tant d'un point de vue personnel que professionnel. La rigueur et le goût du travail bien fait font maintenant partie de mon bagage. Les deux ans que j'ai passé dans votre service ont été formidables. Un seul regret, que vous ne soyez pas là le jour de ma thèse...

Soyez assurés de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

A monsieur le docteur Roger Leandri,

Merci pour tout Roger, merci de m'avoir soutenu pendant les commandes, manips et rédactions de ma thèse. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et ta (très) grande patience.

Merci de m'avoir donné goût à la recherche, et qui sait, peut être qu'un jour...

Sois assuré de mon immense respect et de toute ma gratitude.

A ma famille...

A mes parents,

Maman,

Je te remercie pour ta douceur, ta joie de vivre et ton sens de l'organisation... Je te remercie de nous avoir offert l'enfance que nous avons eue et je te remercie d'être toujours là quand on a besoin de toi. Tu m'as montré la valeur des choses réellement importantes dans la vie, et grâce à ça je sais que je serai toujours heureuse.

Papa,

Merci de m'avoir donné le goût de la médecine et du travail (mesuré) mais aussi du ski, du voilier, du VTT, du tracteur, ski nautique, randonnée et de l'aventure, bref que des trucs de fille. Sans toi je ne serai pas ici aujourd'hui. Merci de m'avoir prêté ton rêve de voyage en voilier, je te le rendrai à mon retour.

A Pauline,

Allez je t'excuse pour l'incident de l'allumette géante, toi aussi t'es trop parfaite ! Merci de m'avoir toujours embarquée dans tes aventures, pédestres, équestres ou rocambolesques. Ta **noisette** est déjà bien partie dans la vie avec une maman comme tu seras. Et courage, plus que quelques mois et... **Pierre –Benoît**, merci de si bien t'occuper de notre popo nationale ! Merci de supporter nos élucubrations... et merci pour ta générosité et ton attention pour les autres (bref tu es un super Beauf).

A Alice,

Ma nainasse, je t'adore, reste comme tu es ! Je parle au nom de pas mal de personnes en te remerciant pour tes textos post premier soir qui nous ont permis de conclure. Tu as toujours été très lucide sur beaucoup de sujets et même très jeune (sauf pour la lecture... non Alice tu ne savais pas lire à 4 ans). Pense bien à moi quand tu feras tes virages en poudre cet hiver ou la prochaine fois que tu iras serrer la pince à des ours... avec ton **Totorro** qui par miracle a réussi à t'apprivoisé (bravo), très sympa et plein d'humour, vivement d'autres séjours à Zinal !

Aux cousins et leur femmes... mais oui elles sont belles ! Merci d'avoir été des supers grands frères, pour le meilleur et pour le pire ! Et **Nini**, ma deuxième nainasse favorite, t'inquiète Mr R.. est fou de toi ! J'ai adoré faire un maximum de bêtises à vos cotés et j'espère que ce n'est pas terminé !

A mes deuxièmes parents, **Henri et Ariane**, tout est dit dans le titre... merci de toujours nous avoir traitées comme vos enfants. Notre lien avec les cousins est inébranlable et c'est grâce à vous.

A **Papi-Pierre**, merci de m'avoir donné le goût de l'effort et du travail. Maintenant tu vas enfin pouvoir m'appeler docteur pour de vrai... Merci pour tous ces bons moments de ski, merci pour Cala Salions et merci pour tous les vendredis passés chez vous, que du bonheur !

A **Jean-Marie, Lise, Luc et Marie-Josée**, merci pour tous les bons moments passés ensemble, au ski comme à la mer, mais surtout aux champignons pour nos anniversaires que vous n'avez jamais ratés.

Et à toute **Rabi's team, Julien, Pedro, Mathilde, Antoine, Martin, Jeanne et Paul** Vive les rabi, je vous adore ! Spéciale dédicasse à **Pedro**, tu penseras à moi en tapant t thèse... l'enfer !

A Fred, mon **nounou**, mon super man trop pro de la mécanique, électronique, bucheronnage, glisse et autre, avec toi c'est difficile de s'ennuyer! Merci de croire en moi et en mes délires. Merci d'avoir à peu près les mêmes que les miens. J'espère que tu arriveras à me supporter 24h/24h sur le bateau et que nous vivrons heureux, longtemps et aurons beaucoup d'enfants.

A mes copains...

A **Océane**, ma super pote depuis un petit bout de temps maintenant. Merci d'être toujours open pour un apéro au pied levé, merci de te rendre toujours disponible (tu as sauvé ma nainasse et je t'en suis très reconnaissante). J'ai hâte de nous refaire une soirée fille, vin blanc et sushi !

Aux **copines de médecine**, Claire, Marie-Laure, Laure, merci de m'avoir réveillée à la BU...

Aux castrais... Pépou et Phildar, Camille et JB, Isabelle et Moutix, François et Vivi, Brice et Audrey, Fred et Bastos, Antoine et Marie- Catherine, et les autres, merci de m'avoir laissé incruster votre groupe depuis toute petite... et de m'avoir appris à peu près toutes les bêtises à faire en tant qu'adolescente.

Anne-So, on se voit pas beaucoup mais rien de change l'affection que j'ai pour toi, ton mari et ton fils...

Aux 2 cousines ... Aurélie et nini, que de bonnes soirées passées ensemble ! Je vous en souhaite beaucoup d'autres !

Aux voileux... Olivier et Sylvie, Fabien et Nathalie, Laurent et Virginie, Marie et Bernard, merci de nous avoir si bien intégré dans le club de voile de Souston quand on est arrivé avec notre hobbie 16 tout pourri, merci de nous avoir aidés à bricoler Apache. Vous êtes les bienvenus si vous voulez venir faire un tour aux Antilles mais ça vous le savez déjà.

Aux potes de Fred... Marie et Charles, Laure et Arnaud, Olivier et Marthe... et puis tous les autres, merci de m'avoir accueillie si gentiment, chez vous, au ski, à Paris, à Pau... Fred à de la chance de vous avoir comme potes !

A mon **Gros Delin**, et oui tu ne fais plus parti du labo... donc classée dans la case copains. Merci de m'avoir tant fait rire avec tes aventures et mésaventures. Faut pas qu'on se perde de vue ma poule !!!

A ma **Banou**, sœur d'adoption en Corse, merci pour tous ces bons moments et soirées passées là-bas, mais surtout pour les débriefings croustillants le lendemain !

A **Jeff et Marie**, Merci de rester si jeunes ! Merci pour tous les jouets prêtés et qu'on a rabinélisés...c'est-à-dire gardé et un peu usés. A quand la prochaine session de wake ? « hé ce qui est pris n'est plus à prendre alors debout ! »

A toute l'équipe du service d'AMP...

A mes **chères co-internes** ou co-internes chères, Carole merci pour ta franchise et ton sens du travail bien fait, avec toi je m'y suis presque mise ! Bravo pour ta performance en blondeur attitude, respect !

Marie, merci pour ta générosité envers Roger et moi dans les moments de stress (...) Pétillante, et pleine d'humour, on ne s'ennuie pas à tes cotés !

Je me suis vraiment éclatée avec vous, continuez comme ça ! (Au risque d'en choquer quelque uns).

Aux **techniciens(nes) du labo**, Linda hyperactive mais qui trouve le temps de nous laisser apprendre en douceur. Laurence dans le genre rigueur on ne fait pas mieux, merci d'être rassurante et toujours là quand on a un problème. Céline, avec toi tout roule, merci de m'avoir rapidement fait confiance. Et Gégé, So Gégé, il n'y a que quand tu es derrière moi que je ne tremble pas... Merci à vous tous de m'avoir tant appris et surtout d'en avoir eu la patience ! Je me suis bien marrée à vos cotés (le tout dans la concentration et la rigueur bien entendu). Vous formez une bien belle équipe, vous êtes les meilleurs !

Aux **co-internes de gynéco**, la cuvée de cet été à été excellente à l'unanimité !

Aux **techniciennes du CECOS**, merci de votre patience pour nos validations de méthode ! Merci pour tous vos piques niques si délicieux ! Je n'ai toujours pas réussi à déterminer qui est la meilleure cuisinière...un petit concours ?

Aux **sages femmes**, aides **soignantes et secrétaires**, toujours de bonne humeur, travailler à vos cotés a été un plaisir.

A **Marie W**, merci infiniment de m'avoir aidé pour mes stats... je te dois une boîte de chocolats mais je n'oublie pas.

A **Camille**, et ton pacte secret avec Francois.

Passons aux Docteurs...

Aux **assistants, les grands**... Nico, merci de t'être occupé de nous, que des filles ça doit être épuisant parfois ! Tiph, merci pour les bons moments de délire qu'on a eu, au sommet : le pol dance !

A **Dr Issus**, merci pour tes remarques pertinentes sur les meurs de notre société ! Merci pour toutes ces grandes discussions que nous avons eues...

A **Carole Fajau**, merci pour ton calme, ton humour et tes petits dossiers.

A **Florence Lesourd**., notre maman officielle du service, merci de faire tant attention à nos consommation en coca et autre cochonneries.

A **Myriam et Nathalie**, merci de m'avoir appris tous les secrets du CECOS. Merci pour votre douceur et votre disponibilité.

Et à **ceux que j'oublie**, ce service est extraordinaire et c'est grâce à tout le monde !

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS :	3
1. INTRODUCTION :	4
1.1. Développement embryonnaire précoce:	5
1.1.1. La première semaine de développement :	5
1.1.1.1. Segmentation:	5
1.1.1.2. Compaction:	5
1.1.1.3. Cavitation:	6
1.1.1.4. Ecllosion:	7
1.1.2. Métabolisme embryonnaire et éléments nécessaires au bon développement de l'embryon en culture in vitro:	7
1.1.2.1. Métabolisme des carbo-hydrates :	7
1.1.2.2. Métabolisme des acides aminés :	7
1.1.2.3. Autres adjuvants nécessaires :	8
1.2. Culture embryonnaire en FIV :	8
1.2.1. Les avantages et inconvénients d'une culture prolongée par rapport à une culture embryonnaire classique :	9
1.2.2. Les milieux uniques et les milieux séquentiels :	10
1.2.2.1. Les milieux non séquentiels (milieux uniques):	10
1.2.2.2. Les milieux séquentiels :	10
1.2.2.3. Comparaisons entre les deux types de milieux :	11
1.3. Implication de la FIV dans les phénomènes épigénétiques au cours du développement embryonnaire:	13
1.4. Le Bisphénol A :	17
1.4.1. La molécule, production et utilisation :	17
1.4.2. Exposition et métabolisme :	19
1.4.3. Mécanismes d'action du bisphénol A :	20
1.4.3.1. Récepteurs nucléaires des œstrogènes alpha et bêta:	20
1.4.3.2. Récepteurs des œstrogènes membranaires:	21
1.4.3.3. Récepteur aux androgènes:	21
1.4.3.4. Récepteur relié aux œstrogènes ERRγ:	21
1.4.3.5. Affinité avec d'autres récepteurs:	21
1.5. Effets sanitaires du bisphénol A:	21
1.5.1. Effets du bisphénol A sur la santé chez l'adulte :	21
1.5.1.1. Système reproducteur mâle:	21
1.5.1.2. Système reproducteur femelle:	22
1.5.1.3. Autres effets du BPA:	22
1.5.2. Effets du bisphénol A sur les embryons avant l'implantation:	23
1.5.3. Effets précoces du BPA sur la méthylation de l'ADN.	24
1.5.4. Bisphénol A dans les milieux de culture embryonnaire ?	25
1.5.4.1. Etude de Mahalingaiah et al (2012)[88]: Bisphenol A is not detectable in media or selected contact materials used in IVF.	26
1.5.4.2. Etude préliminaire réalisée dans le laboratoire :	26
1.6. Objectifs de l'étude :	29
2. MATERIELS ET METHODES :	30
2.1. Les milieux de culture étudiés :	30
2.1.1. Milieux uniques :	30
2.1.2. Milieu séquentiel :	31
2.1.3. Supplémentation protéinique :	31
2.2. Protocole d'évaluation des milieux de culture étudiés :	31
2.2.1. Contrôle du matériel utilisé :	31
2.2.2. Dépistage du Bisphénol A dans les conditionnements commerciaux :	32

2.2.3. Evaluation de l'effet des conditions de culture en FIV sur la concentration du Bisphénol A dans les milieux de culture :	33
2.2.4. Evaluation de l'effet de différents types de supplémentation protéinique sur la concentration du bisphénol A dans les milieux de culture :	34
2.3. Méthode de dosage du bisphénol A :	35
2.3.1. Principe de la technique utilisée :	35
2.3.2. Préparation des échantillons :	36
2.3.3. Mesure :	37
2.4. Tests statistiques utilisés :	38
3. RESULTATS :	39
3.1. Contrôle du matériel utilisé :	39
3.1.1. Matériel utilisé au cours de notre expérimentation :	39
3.1.2. Matériel utilisé en routine dans le laboratoire de FIV du CHU de Toulouse :	40
3.2. Dépistage du bisphénol A dans les conditionnements commerciaux :	41
3.3. Cinétique de la concentration du bisphénol A dans les conditionnements commerciaux :	42
3.4. Evaluation de l'effet des conditions de culture en FIV sur la concentration du bisphénol A dans les milieux de culture :	43
3.5. Evaluation du l'effet de différents types de supplémentation protéinique sur la concentration de bisphénol A dans les milieux de culture :	44
4. Discussion et Conclusion :	45
ANNEXES :	51
REFERENCES :	53

LISTE DES ABREVIATIONS :

AcN : Acétonotriple
BPA: Bisphénol A
BPA d16 : Bisphénol A deutérisé.
DES: Diethylstilbestrol
ER α , ER β : Estrogen Receptor α , Estrogen Receptor β
ERR γ : Estrogen Related Receptor γ
ESI: Electrosray Ionization
EDTA: Acide Ethylène Diamine Tétracétique
FIV: Fécondation In Vitro
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
HSA: Human Serum Albumin
ICSI: Intracytoplasmic sperm injection
LOQ: Limite de quantification
MRM: Multiple Reaction Monitoring
PE: Perturbateur Endocrinien
PPAR γ : Peroxisome Proliferator activated receptor γ
SERM: Selective Estrogen Receptor Modulator
SSS: Serum Substitute Supplement
UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography

1. INTRODUCTION :

Depuis plusieurs années l'attention des scientifiques, des médias et maintenant du public s'accroît vis-à-vis des effets de certaines substances chimiques environnementales pouvant interférer sur les systèmes hormonaux. Ces perturbateurs endocriniens peuvent être de diverses origines: hormones naturelles des mammifères, substances végétales naturelles (phytohormones), produits phytosanitaires (herbicides, fongicides, insecticides...) ou polluants de l'industrie chimique (alkylphénols, bisphénol A, phtalates, métaux lourds...)[1].

Plusieurs études ont établi, dans les populations animales sauvages, un lien entre la présence de polluants connus pour mimer l'action d'hormones notamment stéroïdiennes et la survenue d'anomalies du développement ou de la reproduction. Chez l'homme, ces effets sont plus difficiles à démontrer mais l'expérience amère du diéthylstilbestrol (DES) a clairement illustré l'effet que pouvait avoir un PE sur la fertilité humaine, et ce sur plus d'une génération.

Aujourd'hui, c'est le bisphénol A qui est mis en avant. Après de nombreux travaux expérimentaux chez les animaux et de plus rares études chez l'homme, les communautés scientifiques et médicales se sont accordées : le bisphénol A présente un danger pour la santé humaine [2-4]

Depuis que le bisphénol A est suspecté de produire des effets négatifs, la vente de biberons contenant ce composé chimique est interdite en Europe (janvier 2011) et cette interdiction s'étendra, en France, à tous les contenants alimentaires à partir de juillet 2015. Mais l'exposition au bisphénol A peut être d'autres origines qu'alimentaire. Ainsi, des nouveau-nés prématurés hospitalisés en réanimation néo-natale sont fortement exposés au bisphénol A via leurs tubulures de perfusion [5]. Ceci démontre de façon criante la possibilité d'une exposition d'origine iatrogène à ce perturbateur endocrinien.

Dans ce cadre, se pose la question de l'impact que pourrait avoir le BPA sur des embryons humains au tout début de leur développement au cours d'une FIV. En effet, la fécondation in vitro se déroulant dans des boîtes de culture en plastiques et des milieux synthétiques commerciaux, il est possible que les embryons soient exposés à ce perturbateur endocrinien.

Nous avons donc cherché à répondre à cette question en évaluant la présence de BPA dans les milieux de culture utilisés en routine pour la culture embryonnaire en FIV.

1.1. DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PRECOCE:

Comment ce développe un embryon humain et de quoi a-t'il besoin pour une croissance optimale dans les premiers jours ?

1.1.1. La première semaine de développement :

1.1.1.1. Segmentation:

Environ 26 à 30 heures après la fécondation et jusqu'au 6^{ème} jour, l'embryon va se segmenter au sein de la zone pellucide. Les premières divisions vont donner naissance à des blastomères de même taille et parfaitement identiques. Au 3^{ème} jour l'embryon possède huit cellules, le génome embryonnaire jusqu'ici inactif se met en route.

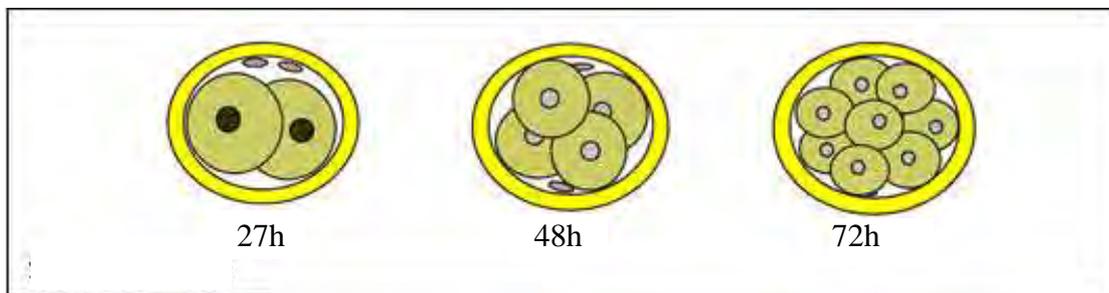


Figure 1 : La segmentation embryonnaire.

1.1.1.2. Compaction:

A partir de 8 cellules, les premiers contacts cellulaires apparaissent, l'embryon devient une morula. En exprimant des protéines membranaires spécifiques telles que la E-cadhérine, les cellules vont mettre en place des jonctions adhérentes, des jonctions communicantes (GAP-junctions) et des jonctions serrées. Ainsi, au cours des divisions cellulaires suivantes, on va pouvoir observer une compaction de la morula associée à une polarisation cellulaire (les cellules périphériques isolant les cellules internes du milieu extérieur). Ce phénomène est à la base de la différenciation cellulaire.

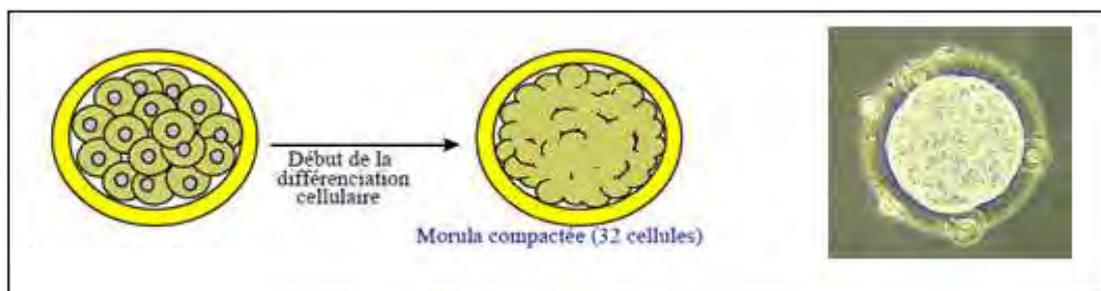


Figure 2 : la compaction embryonnaire.

1.1.1.3. Cavitation:

La cavitation débute une fois que les jonctions serrées sont mises en place. Associées aux pompes Na/K-ATPases, celles-ci permettent l'apparition et le maintien d'un gradient osmotique entre le milieu extra embryonnaire et intra embryonnaire. Les aquaporines vont laisser passer l'eau de l'extérieur vers l'intérieur. Le blastocèle se forme et s'expand progressivement, à l'origine de la première augmentation du volume embryonnaire. Parallèlement, les blastomères se différencient en trophoblaste et en masse cellulaire interne.

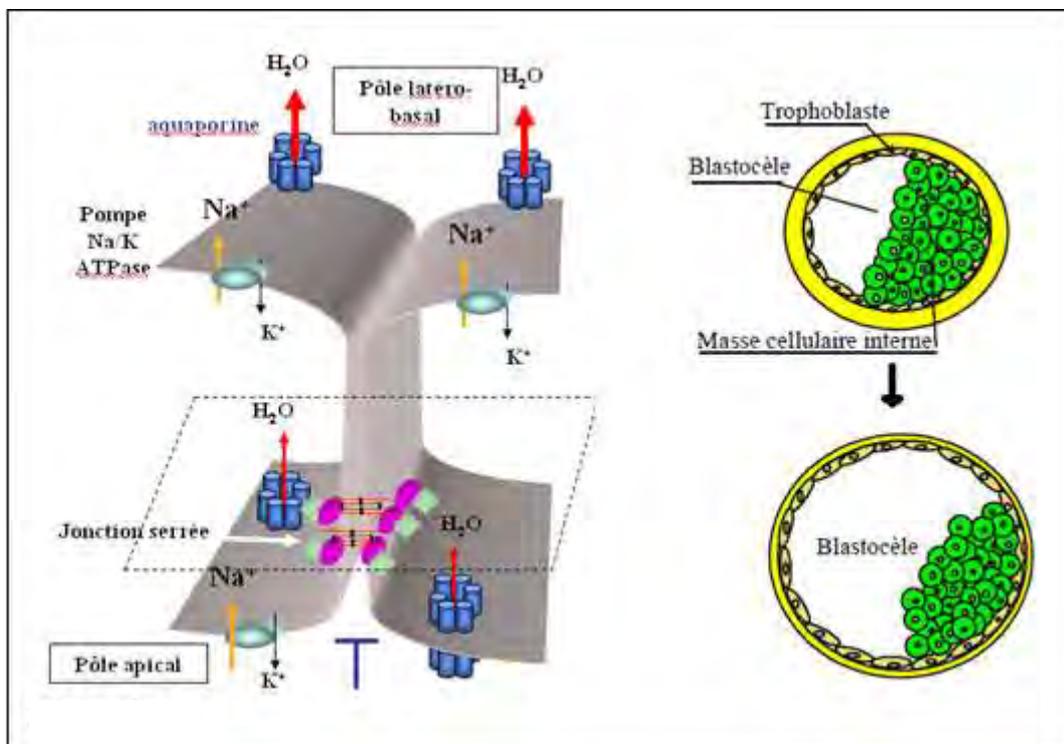


Figure 3 : La cavitation.

1.1.1.4. Eclosion:

Au 6ème jour, le blastocyste se dégage d'une zone pellucide amincie sous l'effet de l'expansion de ce dernier et altérée par une lyse enzymatique d'origine trophoblastique. Il pourra alors amorcer son implantation dans l'endomètre.

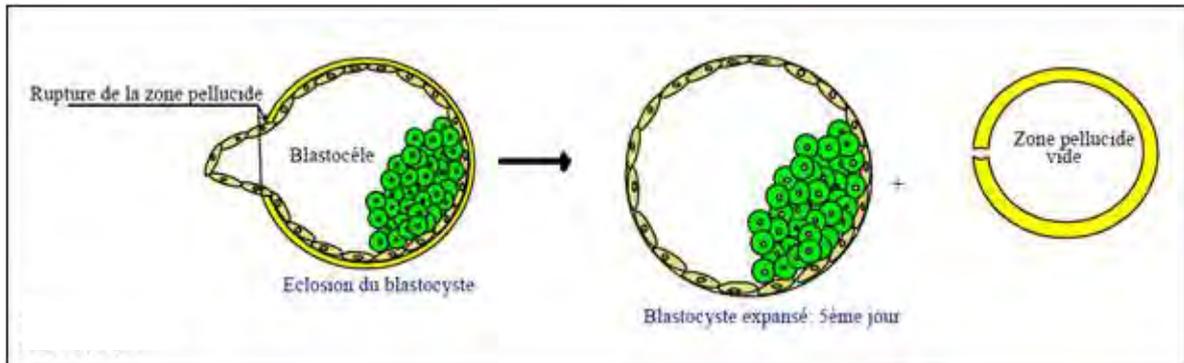


Figure 4 : Eclosion du blastocyste.

1.1.2. Métabolisme embryonnaire et éléments nécessaires au bon développement de l'embryon en culture in vitro:

1.1.2.1. Métabolisme des carbo-hydrates :

Dans la première phase du développement embryonnaire (du clivage au stade morula) l'embryon métabolise de préférence le lactate et le pyruvate. A partir du stade morula, la mise en place d'une polarité cellulaire ainsi que la création du blastocèle nécessitent un métabolisme énergétique important pour faire fonctionner les pompes Na/K ATPase. Le glucose devient alors le principal pourvoyeur d'énergie [6] [7].

1.1.2.2. Métabolisme des acides aminés :

De même les besoins en acides aminés sont différents en fonction du stade de développement de l'embryon. De 1 à 8 cellules, l'apport d'acides aminés non essentiels possède un effet bénéfique sur la croissance embryonnaire. A partir de 8 cellules, les acides aminés essentiels sont nécessaires à la poursuite du développement de l'embryon [8].

La dégradation des acides aminés (et plus particulièrement de la glutamine) entraîne une augmentation des ions ammoniums NH_4^+ qui sont toxiques pour l'embryon. D'où l'importance de renouveler régulièrement le milieu de culture ou d'utiliser de la glutamine « stabilisée » (L-Alanyl-L-Glutamine ou L-Glycyl-L-Glutamine).

1.1.2.3. Autres adjuvants nécessaires :

- *Une source de macromolécules:*

Pendant longtemps le sérum de la patiente était utilisé. Actuellement les macromolécules utilisées en routine sont de l'albumine humaine (purifiée ou recombinante) ou des substituts de sérum comportant de l'albumine et des α -globulines [9]. Ces protéines fixent les toxines et les radicaux oxygénés, libérés par les embryons ou déjà présents dans le milieu de culture. Elles ont un effet tampon, régularisent le pH et facilitent la manipulation des embryons (effets tensio-actif qui empêche l'adhésion des embryons aux surfaces) [10].

- *L'acide hyaluronique :*

Principal glycosaminoglycane du tractus génital féminin, il aurait un effet bénéfique en culture embryonnaire et pour le transfert des embryons [11].

- *L'EDTA :*

En inhibant l'activation de la glycolyse, il serait bénéfique au stade précoce du développement embryonnaire mais il est délétère après la compaction [12].

1.2. CULTURE EMBRYONNAIRE EN FIV :

Au cours d'une FIV, on s'efforce de rester le plus proche possible des conditions naturelles de la croissance embryonnaire : température, pH, environnement moléculaire et apport d'énergie...

Les ovocytes ponctionnés sont fécondés par deux techniques différentes en fonction de l'indication : la FIV classique (mise en contact rapproché des spermatozoïdes avec les ovocytes dans un milieu de fécondation) ou bien l'ICSI (injection d'un seul spermatozoïde dans chaque ovocyte à l'aide d'une micro-pipette).

Les ovocytes sont ensuite disposés dans des microgouttes de milieux de culture et mis dans une étuve à 37 °C et sous atmosphère contrôlée en CO₂. Le lendemain de la fécondation (J1), on observe l'apparition des deux pronuclei signant la fécondation des ovocytes. En fonction du type de milieu utilisé et des recommandations du fournisseur, ils sont changés de milieu.

Le surlendemain (J2), les embryons sont observés et évalués selon divers critères prenant en compte le nombre de cellules, leurs tailles et la présence ou non de fragments cellulaires. On peut alors les transférer, les congeler, continuer à les laisser croître in vitro pour un transfert à J3 ou les faire évoluer jusqu'au stade blastocyste.

1.2.1. Les avantages et inconvénients d'une culture prolongée par rapport à une culture embryonnaire classique :

L'utérus étant considéré comme le meilleur milieu de développement des embryons, il était classique de les cultiver durant 2 à 3 jours afin d'évaluer leur potentiel de développement et de les transférer rapidement chez les patientes.

La culture prolongée, jusqu'au stade blastocyste (J5-J6), a été mise en place tardivement dans les années 90. Elle nécessite d'adapter les milieux de culture aux besoins des embryons (glucose, pyruvates et acides aminés par exemple).

Les embryons qui parviennent à croître jusqu'au stade blastocyste ont un fort potentiel d'implantation. En effet, un embryon arrivant à se développer jusqu'à ce stade montre que son génome fonctionne correctement (activation du génome embryonnaire dès 8 cellules à partir duquel sont transcrits les gènes impliqués dans la compaction et la cavitation). Ce type de culture permet de mieux choisir l'embryon à transférer et ainsi de diminuer le nombre d'embryons remis dans la cavité utérine. Le risque de grossesses multiples est alors abaissé. L'embryon arrive dans l'utérus au même niveau de développement que dans le cadre d'une fécondation naturelle. Il est donc soumis à un stress moins important que s'il était transféré à 4-8 cellules [13]. De plus le transfert étant plus tardif, l'embryon n'est pas au contact des forts taux d'estrogènes dus à la stimulation ovarienne qui seraient nocifs pour sa croissance [14].

Cependant, la proportion d'embryons qui se développent jusqu'à ce stade est moins importante, il y a moins d'embryons surnuméraires à congeler et, dans le pire des cas, il peut arriver qu'il n'y ait pas d'embryons à transférer lors d'une tentative de FIV [15].

Diverses études ont essayé de comparer la culture classique à la culture prolongée, une revue de la littérature a été réalisée sous forme de méta-analyse [16]. Selon celle-ci, la culture embryonnaire prolongée permet un plus grand nombre de naissances vivantes par couple, mais seulement pour des couples avec un bon pronostic et de beaux embryons à J2-J3. Par contre, si on évalue le taux de grossesses cumulées (grossesses après un transfert frais + grossesses après transfert d'embryons congelés) le taux de réussite par couple est en faveur de la culture classique avec un transfert à J2-J3.

Ainsi, à ce jour, il n'est pas évident que la culture prolongée apporte de meilleurs résultats en matière de grossesse. Une amélioration pourrait cependant être constatée dans les prochaines années avec l'optimisation des milieux de culture et l'introduction de la vitrification qui paraît être mieux adaptée aux blastocystes.

Il reste cependant à vérifier l'innocuité des milieux de culture pour les embryons lors de contacts prolongés avec ceux-ci.

1.2.2. Les milieux uniques et les milieux séquentiels :

Si on veut cultiver les embryons jusqu'au stade de blastocyste (J5 ou J6), plusieurs types de milieux peuvent être utilisés [12] :

1.2.2.1. Les milieux non séquentiels (milieux uniques):

Il s'agit de milieux dans lesquels tous les métabolites et adjuvants nécessaires au bon développement embryonnaire sont présents dès le début de la culture de l'embryon. L'embryon « choisit » les métabolites qui lui conviennent le mieux en fonction de son stade de développement.

Ils peuvent être utilisés en continu sans renouvellement du milieu tout au long de la croissance de l'embryon (milieux uniques non renouvelés) ou bien être changés à intervalles réguliers (milieux uniques renouvelés).

1.2.2.2. Les milieux séquentiels :

Les connaissances sur le métabolisme embryonnaire au cours de son développement préimplantatoire ayant évoluées [13], les milieux séquentiels ont vu le jour.

Ils ont pour objectif de mimer ce qui se passe in vivo en apportant, de manière séquentielle, les éléments nécessaires au bon développement de l'embryon quand celui-ci en a besoin.

Ils sont sous forme de deux séquences. Chacune contient les éléments dont l'embryon a besoin pour la première phase (avant la compaction) ou pour la deuxième phase de son développement (pendant et après la compaction).

Selon les milieux et les équipes le passage du milieu de 1ère phase de la séquence à celui de 2ème phase de la séquence se fait soit à J2 soit à J3. Les milieux sont changés toutes les 24 ou 48 heures.

1.2.2.3. Comparaisons entre les deux types de milieux :

Il n'existe pas de milieu parfait, chacun possède des avantages et des inconvénients qu'il convient de prendre en compte :

	Milieux uniques non renouvelés	Milieux uniques renouvelés	Milieux séquentiels
Accumulations de facteurs de croissance endogènes	Oui	Non	Non
Renouvellement des nutriments essentiels	Non	Oui	Oui
Accumulation des toxines	Oui	Non	Non
Stress sur l'embryon	Bas	Moyen	Haut
Temps de travail et coût	Bas	Moyen	Haut

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des milieux uniques ou séquentiels [17].

La majorité des études réalisées sur le sujet montrent que la qualité embryonnaire (nombre de cellules, taux de fragmentation et taille des blastomères) n'est pas modifiée si on utilise un milieu unique ou séquentiel. De même, le taux d'implantation et de grossesse ne varie pas.

Les données périnatales ne paraissent pas être modifiées en fonction de l'utilisation d'un milieu ou d'un autre.

Etudes	Milieux étudiés		Population étudiée	Critères	Résultats
	Milieu unique	Milieu séquentiel			
Basile et al 2013 [18]	Global ®	Cleavage Medium (SAGE®)	Randomisation 75 donneuses d'ovocytes. 723 ovocytes	Cinétique de croissance embryonnaire (embryoscope), fragmentation et taille des blastomères. Taux d'implantation (à J3).	Pas de différence significative.
Paternot et al. 2010 [19]	Gynemed® GM501	Cook®	178 couples (sans tiers donneur), 1002 embryons.	Evaluation embryonnaire à J2 ou J3. Classification de Gardner (J5), Taux d'implantation	Pas de différence significative.
Campo et al 2010 [20]	Gynemed GM501	ISM1 (Origio®)	Patients (sans culture de blastocyste ni tiers donneurs)	Score embryonnaire. Taux d'implantation à J2-3. Grossesses et naissances	Taux de fragmentation plus élevé pour GM501, pas de différence significative pour les autres critères.
Sepulveda et al. 2009 [21]	Global ®	ECM/ Bultblast (Irvine Scientific®)	80 donneuses d'ovocytes.	Score embryonnaire à J3 et J5-6. Taux de grossesse.	Pas de différence significative.
Eaton et al. 2012 [22]	Global ®	G1 (Vitrolife®)	198 patientes avec accouchement d'un singleton	Poids de naissance	Pas de différence significative.
Vergouw et al. 2012 [23]	Human Tubal Fluid (HTF)	Quinn's avantage protein plus medium (Sage®)	Etude rétrospective : 517 patientes enceintes après transfert d'un embryon (frais ou congelé) à J3	Nombre de blastomères. Poids de naissance, complication de grossesse ou anomalies à la naissance	Plus de blastomères pour Sage que pour HTF. Pas de différences significatives pour les autres critères.
Lin et al. 2013 [24]	Global®	G5 (Vitrolife®) Quinn's avantage media	Etude rétrospective : 1201 couples pris en charge entre 2008 et 2010.	Poids et taille de naissance	Pas de différence significative.
Mantikou et al. 2013 [25]	Méta analyse			Scores embryonnaires. Taux de grossesses. Poids de naissance	Difficultés à conclure devant hétérogénéité des études.

Tableau 2 : Etudes comparatives entre les milieux séquentiels et les milieux uniques.

1.3. IMPLICATION DE LA FIV DANS LES PHENOMENES EPIGENETIQUES AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE:

La culture embryonnaire en FIV n'est tout de même pas optimale. Elle pourrait avoir un impact sur les phénomènes épigénétiques qui ont lieu au tout début de développement de l'embryon.

La différenciation cellulaire se met en place sans aucune modification de l'ADN. Elle est basée sur des programmes d'expression génique spécifiques du type de cellule. L'épigénétique est le principal processus permettant la différenciation cellulaire sans aucune modification de l'ADN [26]. La régulation de l'expression génique est possible car l'ADN est « empaquetée » dans une structure dynamique : la chromatine (ADN + Histones). Si, en regard d'une séquence génomique, la chromatine est « fermée », n'autorisant pas l'accès des facteurs de transcription à la molécule d'ADN, il n'y aura pas d'expression du gène. Inversement, une chromatine « ouverte » permettra l'accès des facteurs de transcription à la molécule d'ADN est donc sa transcription [27]. L'aspect ouvert ou fermé de la chromatine est régulé majoritairement par la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones : c'est l'épigénome.

Contrairement au génome qui ne varie presque pas, l'épigénome varie en fonction du type cellulaire mais aussi en fonction de l'environnement. L'épigénome peut être modifié tout au long de la vie d'un individu.

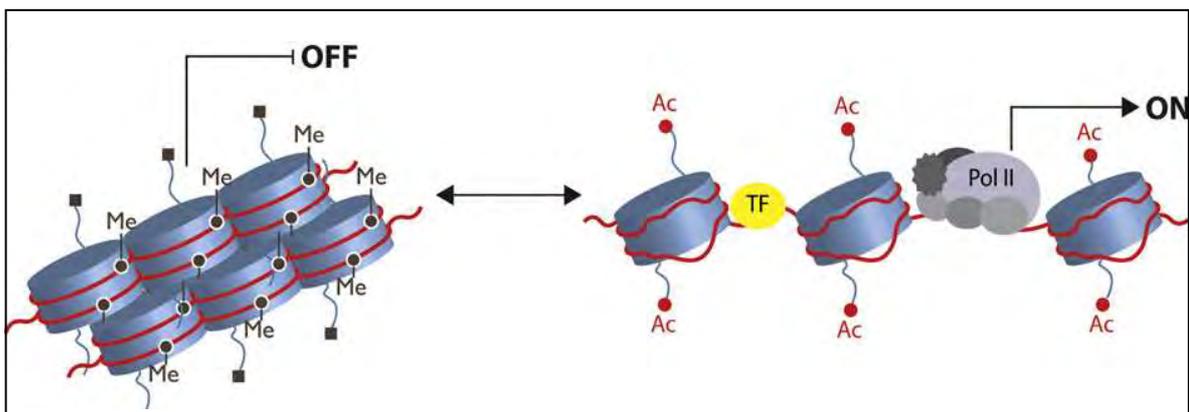


Figure 5 : Structure dynamique de la chromatine [28].

La chromatine de gauche est une chromatine fermée qui empêche l'accès des facteurs de transcription à l'ADN. Elle est associée à une méthylation de l'ADN et à des modifications des histones (désacétylation et méthylation des lysines).

A droite, la chromatine est ouverte et permet l'accès des facteurs de transcription à l'ADN, cette configuration de la chromatine est souvent associée à l'absence de méthylation de l'ADN ou d'acétylation des histones

La fécondation est issue de la rencontre de 2 cellules hautement différenciées (les épigénomes sont très différents). Très rapidement, elle aboutit à l'obtention d'un embryon dont toutes les cellules sont totipotentes, c'est-à-dire non différenciées. Ce changement majeur est consécutif à un processus de reprogrammation de l'épigénome. Les modifications de méthylation de l'ADN et des histones en sont les plus importants témoins. La reprogrammation de l'épigénome consiste à effacer puis à remodeler la méthylation de l'ADN et les modifications des histones sur quasiment tout le génome. Elle intervient à deux stades différents de la vie selon le type de gènes concernés:

- Pour la quasi-totalité des gènes, la reprogrammation épigénétique se produit après la fécondation, au stade embryonnaire précoce (avant l'implantation): les marques épigénétiques sont effacées afin de permettre aux blastomères d'être totipotents, puis, à partir du stade blastocyste, apparaissent de nouvelles marques épigénétiques (distinction entre la masse cellulaire interne et le trophoctoderme). Les seules parties du génome qui ne sont pas touchées par ce phénomène sont les gènes soumis à empreinte parentale.

- Pour les très rares gènes soumis à l'empreinte parentale (une centaine), la reprogrammation épigénétique a lieu au cours de la gamétogenèse. Dès la fécondation et durant toute la vie de l'individu, les gènes soumis à l'empreinte parentale ont une expression mono-allélique soit paternelle soit maternelle [29] dans les cellules somatiques. Les marques épigénétiques sur ces gènes sont donc reçues des parents, mais elles doivent être effacées et reprogrammées dans les cellules germinales au cours de la gamétogenèse, afin que par exemple les gènes soumis à empreinte paternelle soient reprogrammés dans les ovocytes d'une petite fille.

Ainsi, s'il y a une anomalie au cours de la reprogrammation au stade embryonnaire, il peut y avoir des conséquences sur le développement de l'individu. A contrario, si une perturbation intervient au cours de la mise en place de la gamétogenèse, les conséquences seront pour la progéniture issue de cet individu.

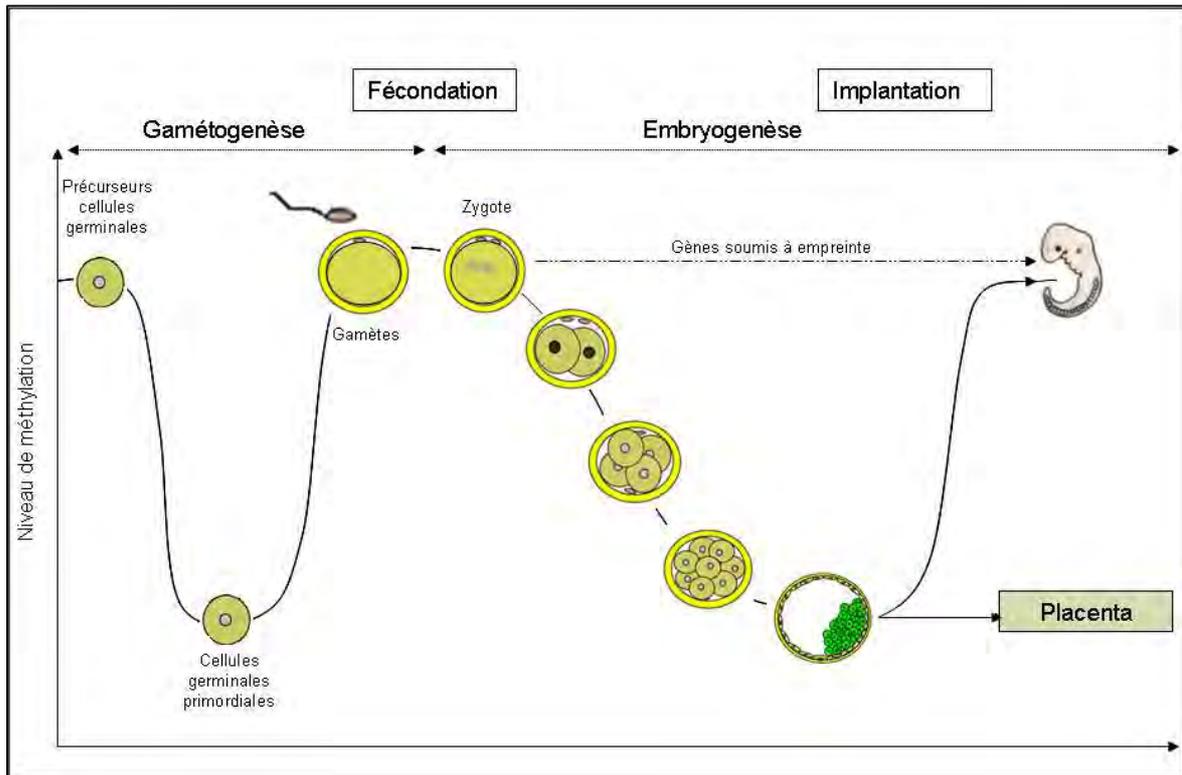


Figure 6: Méthylation de l'ADN et développement des mammifères.

Il est maintenant clair que l'environnement a un impact sur les phénomènes épigénétiques [30, 31]. En effet, le mode l'alimentation de la mère (calories, phyto-médicaments), l'exposition à des stress physiques (température, stress) ou bien chimiques (toxiques, perturbateurs endocriniens) et d'autres facteurs encore inconnus agissent que ces régulations. En considérant toutes les modifications qui ont lieu au cours de l'embryogenèse et de la gamétogenèse, s'il y a exposition à un agent de l'environnement susceptible d'interférer sur les régulations épigénétiques, les conséquences peuvent être considérables.

Une partie importante des modifications épigénétiques à l'œuvre lors de la reprogrammation épigénétique étant concomitante des techniques utilisées en AMP, on se demande de plus en plus si la stimulation ovarienne et la culture embryonnaire n'auraient pas un impact sur les modifications épigénétiques au cours du développement précoce de l'embryon [32]. Et ceci est d'autant plus préoccupant que quelques études mettent en évidence une légère augmentation de la prévalence d'enfants conçus par AMP chez les enfants atteints de pathologies connues comme étant liées à une altération de l'empreinte parentale :

- Le syndrome d'Angelman: caractérisé par des troubles intellectuels sévères apparaissant vers l'âge de 6 mois et entraînant un retard mental associés à des traits dysmorphiques (microcéphalie, macrostomie, hypoplasie maxillaire ou prognathisme...). Due, dans 2 à 5% des cas à un défaut d'empreinte parentale au niveau du chromosome 15[33].
- Le syndrome de Beckwith Wiedemann : syndrome de croissance excessive associant une macrosomie, une macroglossie, une viscéromégalie et des anomalies de développement. Il prédispose au développement de tumeurs embryonnaires, la plus fréquente étant la tumeur de Wilms ou néphroblastome. Cette pathologie serait due à une dérégulation de l'expression des gènes soumis à empreinte de la région chromosomique 11[34].

Les études réalisées chez l'animal vont aussi dans ce sens. En effet, in vivo, on observe des pathologies d'origines épigénétiques après une FIV : augmentation du poids des fœtus et des progénitures [35, 36]... Et les études réalisées in vitro, chez les embryons de souris montrent des altérations de l'empreinte génétique après culture embryonnaire associés à des troubles du développement post natal si ceux-ci sont réimplantés [37].

Bien évidemment, ces différences de maintien de l'empreinte génétique chez les enfants issus de FIV sont rares mais il faut rester très vigilant. D'où l'importance de suivre les enfants de près afin de pouvoir détecter l'apparition de pathologies d'origine épigénétique plus tardives (pathologies cardio-vasculaires et métaboliques par exemple).

1.4. LE BISPHEENOL A :

1.4.1. La molécule, production et utilisation :

Le bisphénol A (4,4'-dihydroxy-2,2-diphénylpropane) est un perturbateur endocrinien de catégorie 3 (les effets du BPA sont fortement suspectés chez l'animal mais non encore prouvés chez l'Homme).

Il est composé de deux cycles aromatiques (phényles) liés par un pont carbone, il appartient à la famille des diphenylalcanes hydroxylés ou bisphénols.

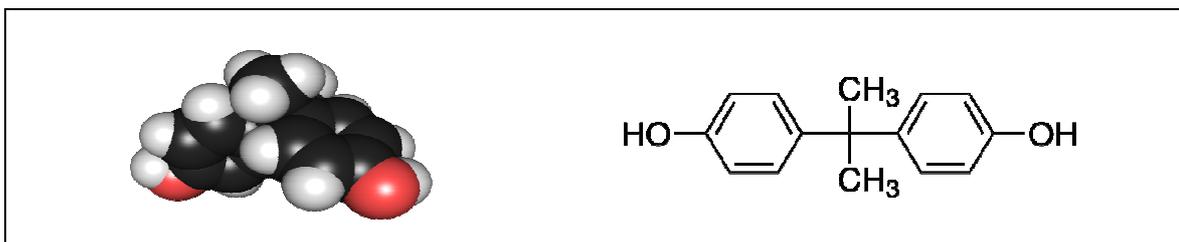


Figure 7: Structure chimique du BPA.

Il entre dans la composition des plastiques de type polycarbonates (plastiques durs et résistants) et des résines époxy (revêtement des boîtes de conserve et des canettes). Il est également utilisé comme additif antioxydant dans le PVC. On le retrouve aussi comme révélateur dans les papiers thermosensibles (tickets de caisses), retardateur de flamme, industrie du béton...

Cette substance chimique est fabriquée en grande quantité, sa production mondiale dépasserait les 3 millions de tonnes par ans. Globalement, la production de BPA est destinée pour 2/3 à la fabrication de polycarbonates et pour 1/3 à la production de résines époxydes. Les domaines d'utilisation des polycarbonates et résines époxydes sont variés et présentés dans les figures ci-dessous. En Europe, 1.15 million de tonnes par an de BPA sont utilisées, principalement pour la fabrication des polycarbonates.

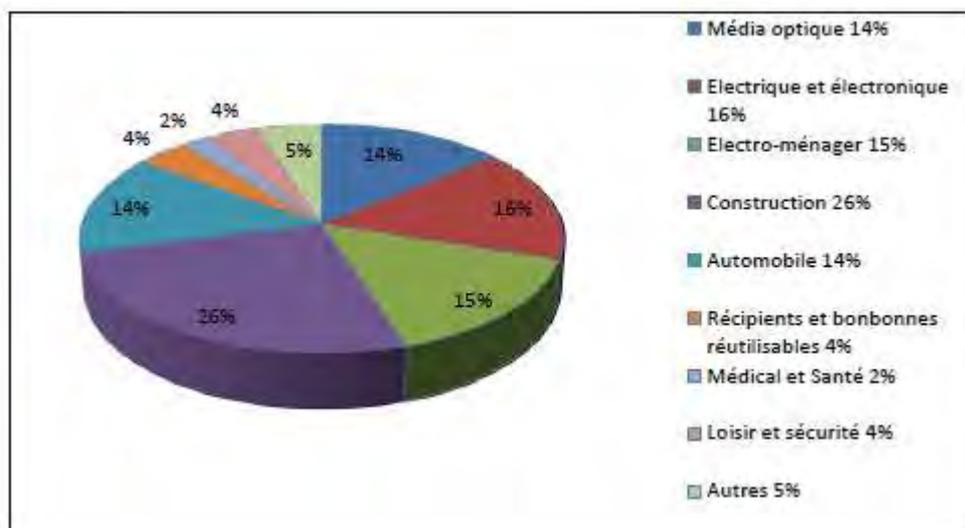


Figure 8: Domaines d'utilisation des polycarbonates (sources : Fédération de la Plasturgie, 2011) d'après Anses, 2013 [3].

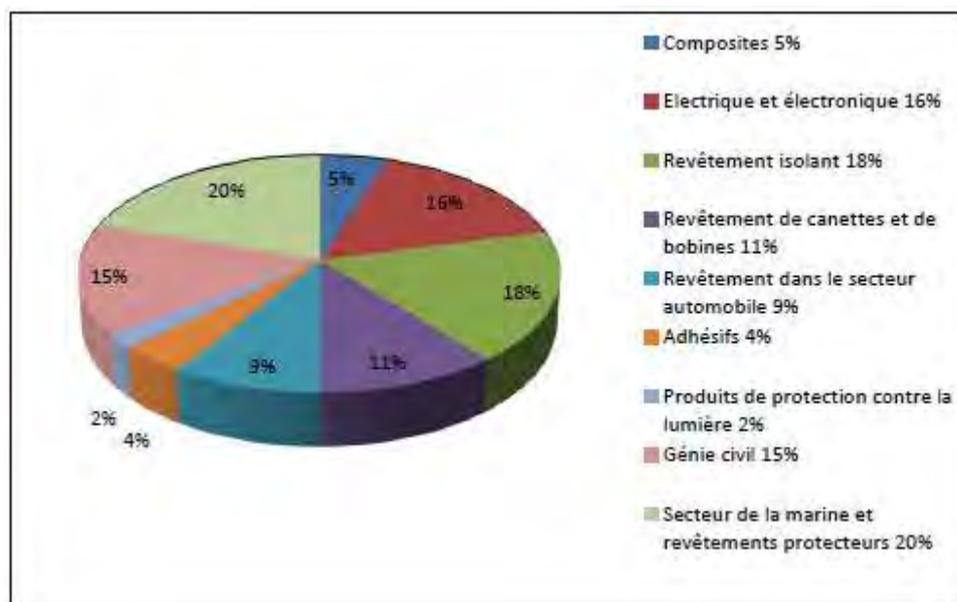


Figure 9: Domaines d'utilisation des résines époxydes (Source : Plastic Europe, 2007), d'après Anses 2013[3].

Usages	Exemples
Industrie agroalimentaire	Canettes de soda, conserves, boîtes de lait en poudre, emballage de plats cuisinés, bouteilles en plastiques, films étirables en PVC.
Produits d'utilisation courante	Plats en plastique pour micro-onde, biberons, vaisselle en polycarbonate, boîtiers de téléphone portable, CD et DVD, montures optiques, phares de voitures...
Applications médicales	Résines pour amalgames dentaires, poches, trocarts, sondes d'intubation, cathéters, filtres...

Tableau 3: Exemples d'utilisation du BPA.

1.4.2. Exposition et métabolisme :

Le principal mode de contamination reconnu pour l'homme est l'alimentation. En effet, les aliments d'origine industrielle sont conditionnés dans des plastiques pouvant contenir du BPA. La contamination se ferait alors par ingestion du BPA résiduel ayant migré dans les aliments, plus particulièrement au cours de leur chauffage dans leur emballage d'origine.

Chez l'adulte, l'exposition alimentaire est d'environ $0.033\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jrs}$, elle est 25 fois plus élevée chez les nourrissons nourris au biberon en polycarbonate. Cette dose est très inférieure à la dose maximale admissible mais elle est compatible avec des expositions décrites chez l'animal comme ayant un effet notoire.

D'autres modes d'expositions ont été avancés (percutanée [38] ou inhalations de poussières de BPA) mais peu de données sont disponibles.

Les mesures de concentrations effectuées dans les populations des pays occidentaux montrent que 95% des personnes ont des niveaux détectables de BPA dans les urines [39]. Outre les urines, il est aussi détecté dans le sang, le lait ou bien le liquide folliculaire [40] à des taux à peu près identiques (1 à 2 ng/mL, soit environ 4 à 8 nM).

Les expérimentations de toxicocinétiques menées chez l'homme montrent que le BPA est totalement absorbé au niveau digestif, puis il est métabolisé au niveau hépatique par conjugaison (BPA-glucuronide) il est ensuite éliminé dans les urines [41, 42]. Il est rapidement métabolisé et ne reste pas longtemps actif chez l'Homme. Chez la femme enceinte, il passe la barrière placentaire [43] et est retrouvé chez le fœtus (même ordre de concentration que chez la mère) [44]. Contrairement à l'adulte, le fœtus n'a pas un foie mature pour métaboliser le BPA. Il reste alors plus longtemps sous sa forme active et est susceptible d'interférer sur le développement des organes.

1.4.3. Mécanismes d'action du bisphénol A :

Le BPA a fait l'objet de plusieurs évaluations de risque sanitaire. D'après les études de toxicité préliminaires [45, 46] les autorités sanitaires européennes ont défini une dose journalière admissible pour l'Homme de 50µg/kg/jour. Cependant, la communauté scientifique admet que le BPA agirait à des doses beaucoup plus faibles en provoquant des effets parfois opposés à ceux observés à forte doses.

1.4.3.1. Récepteurs nucléaires des estrogènes α et β :

Le BPA est un agoniste faible des estrogènes. De part ces deux noyaux phénoliques, il possède une capacité de liaison aux récepteurs aux estrogènes ER α et ER β [47]. Son affinité pour ces récepteurs est cependant très basse (1/1000 de celle des estrogènes pour ER α).

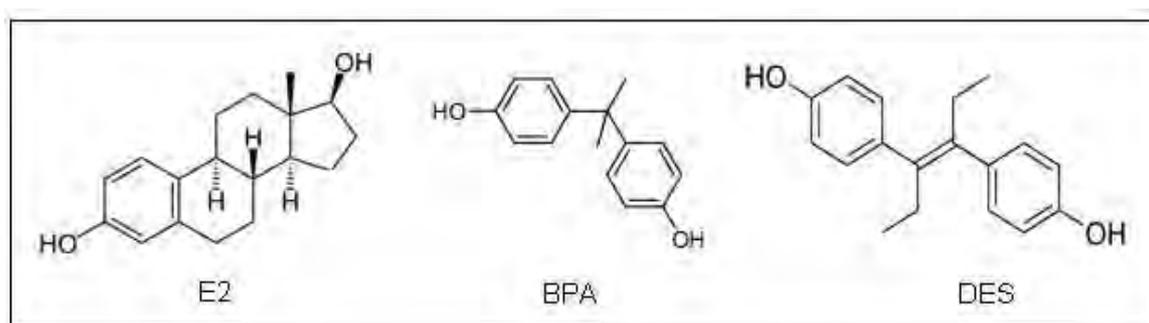


Figure 10 : Structures chimiques de l'oestradiol (E2), du diéthylstilbestrol (DES) et du bisphénol A [4]

Il est considéré comme un *Selective Estrogen Receptor Modulator* (SERM), c'est à dire une molécule à activité agoniste partielle pour les récepteurs aux estrogènes (ER β et ER α). In vitro, le BPA est un agoniste faible du récepteur ER β mais, pour ER α il peut être agoniste ou antagoniste en fonction de la concentration environnante en estrogènes [48].

Cette propriété du BPA n'explique pas, à elle seule, les effets de la molécule à faibles doses. Des études *in vitro* montrent que le BPA agit à des concentrations bien plus faibles que celles auxquelles il se lie aux récepteurs des estrogènes (inférieures au nM) et de manière bien plus rapide (quelques minutes). Il existe donc d'autres voies qui interviennent dans l'action du BPA.

1.4.3.2. Récepteurs des estrogènes membranaires:

Les premiers récepteurs membranaires sur lesquels pourrait agir le BPA sont les formes membranaires de ER α et ER β . Les travaux de Watson et al [49, 50], ont montré que le BPA à dose très faibles (1pM) induisait rapidement l'augmentation du calcium intracellulaire puis une sécrétion de prolactine dans des cellules de la lignée pituitaire.

Un deuxième médiateur des effets non génomiques du BPA pourrait être un récepteur à sept domaines membranaires couplé à la protéine G (GPR30) impliqué dans la prolifération cellulaire [51, 52].

1.4.3.3. Récepteur aux androgènes:

Plusieurs études ont montré que le BPA pouvait se lier au récepteur des androgènes, il aurait un effet antagoniste pour des concentrations de l'ordre du micro molaire et une activité agoniste pour des concentrations de l'ordre du nano molaire [53-55].

1.4.3.4. Récepteur relié aux œstrogènes ERR γ :

Le BPA a également été identifié comme un ligand du récepteur ERR γ avec une affinité de l'ordre de 5nM. [53, 56, 57]. Les fonctions physiologiques de ce récepteur ne sont pas encore bien élucidées mais il paraît pouvoir se lier au même promoteur des gènes que les récepteurs des estrogènes [58]. Cette affinité pourrait expliquer en partie des effets de perturbation endocrine du BPA.

1.4.3.5. Affinité avec d'autres récepteurs:

De plus, le BPA présenterait une affinité pour d'autres récepteurs nucléaires qui sont impliqués dans les effets non reprotoxiques : récepteurs des hormones thyroïdiennes et récepteur PPAR γ (impliqué dans le métabolisme et l'adipogénèse).

1.5. EFFETS SANITAIRES DU BISPHENOL A:

1.5.1. Effets du bisphénol A sur la santé chez l'adulte :

1.5.1.1. Système reproducteur mâle:

Chez l'homme, plusieurs études ont évalué la relation entre le BPA urinaire, les troubles de la fonction sexuelle et la qualité du sperme [59-61]. Elles mettent en évidence une altération potentielle de ces deux paramètres mais présentent des biais importants ne permettant pas de conclure de manière précise.

Chez l'animal, beaucoup d'études ont été réalisées pour examiner l'action du BPA lors d'une exposition in-utéro, néonatale ou chez l'adulte. Les études étant effectuées sur de multiples paramètres et sur divers animaux, il est difficile de conclure. On peut tout de même observer certains effets qui paraissent récurrents au fil des expérimentations notamment une atteinte du développement testiculaire lors d'une exposition néonatale [62, 63] ou une altération de la production spermatique [64] pour une exposition survenant à l'âge adulte.

1.5.1.2. Système reproducteur femelle:

Le BPA pourrait être un facteur de risque d'apparition de l'endométriose. Une exposition prénatale au BPA provoquerait des lésions proches de l'endométriose chez la souris [65] mais les études examinant ce phénomène chez la femme se contredisent [66, 67].

De même, un certain nombre d'études réalisées chez l'animal montrent une augmentation du syndrome des ovaires polykystiques chez les femelles exposées au BPA [68]. Deux études [69, 70] mettent en évidence des concentrations sériques plus élevées chez les femmes atteintes d'un tel syndrome mais ces études présentent des limites importantes.

L'exposition au BPA augmenterait la fréquence de fausses couches spontanées [71] ou de prématurité [72]. On retrouve aussi, chez l'animal, une baisse du taux d'implantation après gavage par BPA [73, 74].

Dans le cadre des stimulations ovocytaire en FIV, il y aurait une altération de la qualité ovocytaire et une baisse du nombre d'ovocytes ponctionnés chez les patientes présentant un fort taux de BPA dans les urines [75, 76].

Les autres données humaines sont issues d'études présentant un nombre important de biais et ne permettent pas de conclure. Par contre, chez l'animal, pour des expositions prénatales ou périnatales on observe un avancement de l'âge de la puberté et une altération du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

1.5.1.3. Autres effets du BPA:

Le BPA aurait beaucoup d'autres effets sur la santé humaine. Les études sont réalisées chez l'animal, très peu de données sont disponibles pour l'homme. Il engendrerait notamment une diminution du développement cérébral périnatal, l'apparition de maladies

cardiovasculaires, du diabète et de troubles thyroïdiens. De même, il favoriserait le développement de tumeurs mammaires et prostatiques.

1.5.2. Effets du bisphénol A sur les embryons avant l'implantation:

Les embryons de souris, au stade préimplantatoire, expriment les récepteurs aux estrogènes ER α et ER β [77] par l'intermédiaire desquels le BPA pourrait affecter leur développement. Ainsi, l'exposition *in vitro* au BPA aurait un effet sur les embryons dès les stades les plus précoces de leur développement, cet effet serait dose dépendant.

A des concentrations de l'ordre de 1 nM, le BPA accélérerait la croissance embryonnaire alors que pour des concentrations de l'ordre de 100 μ M, il la ralentirait [78]. Ces effets sont significativement annihilés par la présence d'un anti-estrogène (le Tamoxifène) dans le milieu de culture, suggérant un effet médié par les récepteurs aux estrogènes. La différence d'effet constatée en fonction de la dose administrée s'explique par le fait que le BPA n'est pas un agoniste pur des estrogènes et peut avoir des propriétés antagonistes en fonction de sa concentration ou de l'environnement cellulaire.

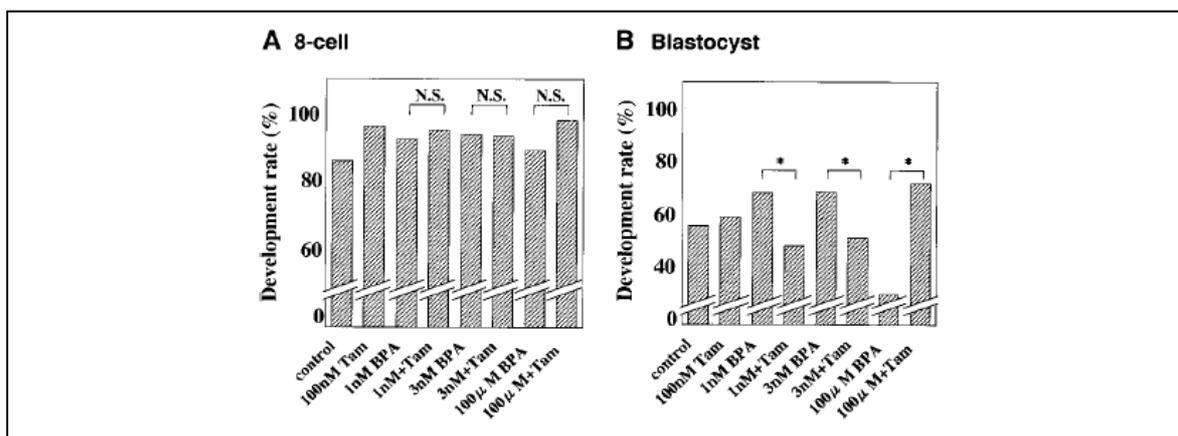


Figure 11 : Effets du BPA et du Tamoxifène sur le développement des embryons de souris (*: $p < 0.01$, N.S. : Non significatif) [78].

Une autre étude retrouve des résultats identiques : en effets, à partir de 10^{-8} M de BPA administré à des embryons de souris au stade deux cellules, on observe une baisse du nombre d'embryons arrivant au stade de blastocyste [79]. Les auteurs avancent comme hypothèse une altération de l'organisation du cytosquelette des blastomères qui les empêcherait de pouvoir dépasser le stade de morula [80].

L'exposition *in vivo* au BPA durant la phase préimplantatoire du développement embryonnaire via une injection quotidienne de 100mg/kg /jour chez la mère, ralentit également le développement embryonnaire [73].

Par ailleurs une exposition *in vitro* au BPA pendant la phase préimplantatoire du développement influencerait sur l'état de santé post natal. En effet, lorsqu'on transfère chez des femelles receveuses non exposées au BPA, des embryons cultivés en présence de BPA (1nM ou 100µM), on n'observe pas d'effets à la naissance (taille des portées, poids des souriceaux), mais au sevrage (à J21 post natal) les souriceaux issus d'embryons exposés au BPA ont des poids significativement plus importants (+ 40%) que ceux du groupe contrôle quelle que soit la dose de BPA[81].

1.5.3. Effets précoces du BPA sur la méthylation de l'ADN.

On ne connaît pas encore les mécanismes à l'origine des effets néfastes du BPA mais les observations réalisées bien après la naissance surpassent le seul mécanisme hormonal et plaident pour des altérations épigénétiques liées à cette exposition précoce.

La première étude qui a mis en évidence un effet potentiel du BPA sur l'épigénétique est l'étude menée par Dolinoy et al en 2007 [82].

Les auteurs utilisent une lignée de souris porteuses d'un allèle métastable du gène *agouti* contrôlant la couleur du pelage. Chez des individus porteurs du même gène, l'expression de cet allèle est variable en fonction des modifications épigénétiques établies au cours du développement précoce. Ainsi, le statut de méthylation de ce gène peut être suivi par la couleur des progénitures. Des femelles exposées à des fortes doses de BPA avant et au cours de la gestation ont une progéniture saine mais un excès de couleur jaune clair signant une surexpression du gène *agouti* par défaut de méthylation. Un autre gène métastable montrait aussi une hypométhylation. Cette étude suggère que le BPA (à fortes doses) peut altérer l'épigénome.

Le BPA agirait aussi sur l'épigénome pour des doses plus faibles, on retrouve des altérations de la méthylation de l'ADN après gavages de souris entre 10-20µg/kgs/jrs. Cette dose de BPA est à peu près équivalente à l'exposition quotidienne des habitants des

pays occidentaux [61, 83]. La majorité des études a mis en évidence un effet délétère du BPA sur l'épigénome après une exposition tout au long de la grossesse ou bien après l'implantation [28, 84, 85]. L'équipe de Susiarjo [83] a exposé des souris 15 jours avant la grossesse et dans les premiers jours après fécondation. Ils montrent que le BPA, à faible dose (environ 8nM) et de manière très précoce, agit sur la méthylation de certains gènes (notamment celui connu pour être impliqué dans le syndrome d'Angelman). Dans cette étude, le placenta présente plus de troubles de la méthylation de l'ADN que les embryons et paraît être atteint dans son développement.

La voie par laquelle agit le BPA n'est pas encore totalement élucidée. Pour des concentrations de l'ordre du pico ou du nano molaire, il induirait, via un récepteur non nucléaire, une activation des voies de phosphorylations PI3K/AKT qui mènerait à une inactivation de l'histone-méthyl-transférase (EZH2), l'histone déméthylase et de beaucoup d'autres régulateurs de la programmation épigénétique [86].

Le BPA intervient dans la régulation de l'épigénèse au cours de la vie prénatale. L'évaluation de l'impact du BPA sur le développement embryonnaire précoce au cours d'une culture *in vitro* n'a pas encore été réalisée. On peut cependant être mené à penser que cette molécule doit avoir les propriétés identiques *in vitro* et donc induire des troubles de la méthylation de l'ADN lors de la culture embryonnaire en FIV.

Il est possible que la présence involontaire de BPA dans les conditions de culture explique en partie la recrudescence des anomalies épigénétiques observées après culture embryonnaire chez l'animal comme chez l'homme.

1.5.4. Bisphénol A dans les milieux de culture embryonnaire ?

Les milieux de culture embryonnaire utilisés chez l'homme ont des procédés de fabrication et de conditionnement potentiellement contaminants vis-à-vis du BPA (contact avec des matières plastiques...). De plus, d'autres perturbateurs endocriniens tels que les phtalates présents dans les matières plastiques ont été retrouvés dans certains milieux de culture embryonnaire utilisés chez l'homme et plus particulièrement dans les substituts de sérum [87]. Il est donc important de savoir si le BPA est également présent dans les milieux de culture. Seule une étude à ce jour a évalué cette contamination.

1.5.4.1. Etude de Mahalingaiah et al (2012)[88]: Bisphenol A is not detectable in media or selected contact materials used in IVF.

Le BPA était dosé dans les conditionnements commerciaux et après 48 heures d'incubation à 37° avec 5% de CO₂. Trois types de milieux ont été testés :

- Un milieu pour aspiration des follicules (Sage ®), testé 2.5 mois après fabrication.
- Un milieu pour insémination : Quinn's Advantage Fertilization Medium (Sage ®), utilisé 52 jours après fabrication.
- Un milieu de culture embryonnaire : G1 (VitroLife®) ouvert 3 mois après réception.

Le matériel utilisé en routine a aussi été évalué en réalisant diverses combinaisons de milieux et boîtes de cultures (2 types de boîtes de culture Falcon ® et des Boîtes 4 puits nunc ®)

L'équipe a également évalué la tubulure de ponction (COOK®) en faisant passer du milieu d'aspiration des follicule au travers et en le récupérant après 10 minutes d'incubation à 37°C.

Le BPA était dosé par HPLC couplé à une spectrométrie de masse ayant une limite de quantification variant de 1.197nmol/L à 4.197nmol/L en fonction des examens. Il n'a pas été retrouvé de BPA ni dans les milieux de culture utilisés ni dans le matériel testé. Cependant seuls quelques milieux sont testés sur un seul lot. Les conditions de FIV ne dépassaient pas 48 heures et l'huile minérale n'était pas utilisée. Cette étude paraît rassurante mais n'est réalisée que sur un petit échantillonnage de milieux de culture et sur seulement un lot du milieu. Il paraît donc prématuré de conclure sereinement à l'absence de BPA dans les milieux de cultures et le matériel de FIV.

1.5.4.2. Etude préliminaire réalisée dans le laboratoire :

Lors d'une étude préliminaire, nous avons voulu détecter la présence de BPA dans 2 types de milieux de culture : non séquentiel (Global® - LifeGlobal ®) et séquentiel (G-1™v5 PLUS/ G-2™v5 PLUS - VitroLife®), ainsi que pour des concentrations croissantes de HSA purifiée. Le dosage de BPA a été réalisé par HPLC couplée à une spectrométrie de masse. Nous avons retrouvé du BPA à des concentrations de 3.0nM (+/-1.8), 2.9nM(+/-1.5) et 2.3nM(+/-1.9) dans le milieu G1®, G2® et Global® respectivement. Toutefois, au sein des échantillons évalués, la variabilité était importante.

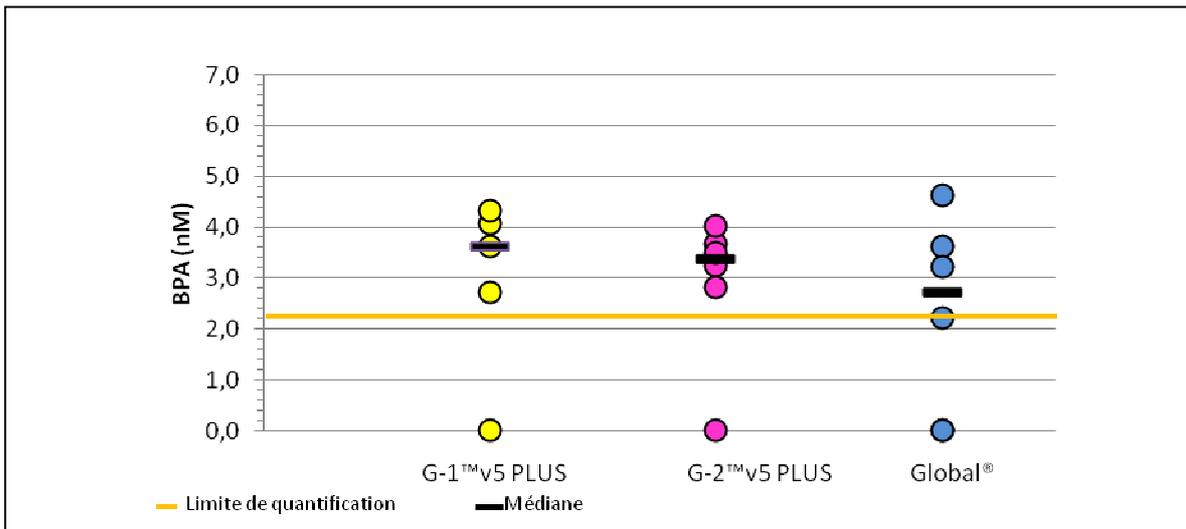


Figure 12 : BPA dans les conditionnements commerciaux (étude préliminaire). Chaque point représente un dosage, nous avons retrouvé une grande variabilité intra et inter analyse.

Utilisés dans des conditions de culture : microgouttes sous huile et après incubation pendant 48 heures, la concentration de BPA ne variait pas. De même l'ajout de HSA dans le milieu Global ® à des concentrations croissantes n'influe pas sur le taux de BPA.

Le BPA était dosé dans un même flacon de milieu à plusieurs semaines d'intervalle. Nous avons noté une décroissance de la concentration de BPA au cours du temps. Cette tendance n'était pas statistiquement significative mais nous a fait évoquer une possible dégradation du BPA au cours du temps.

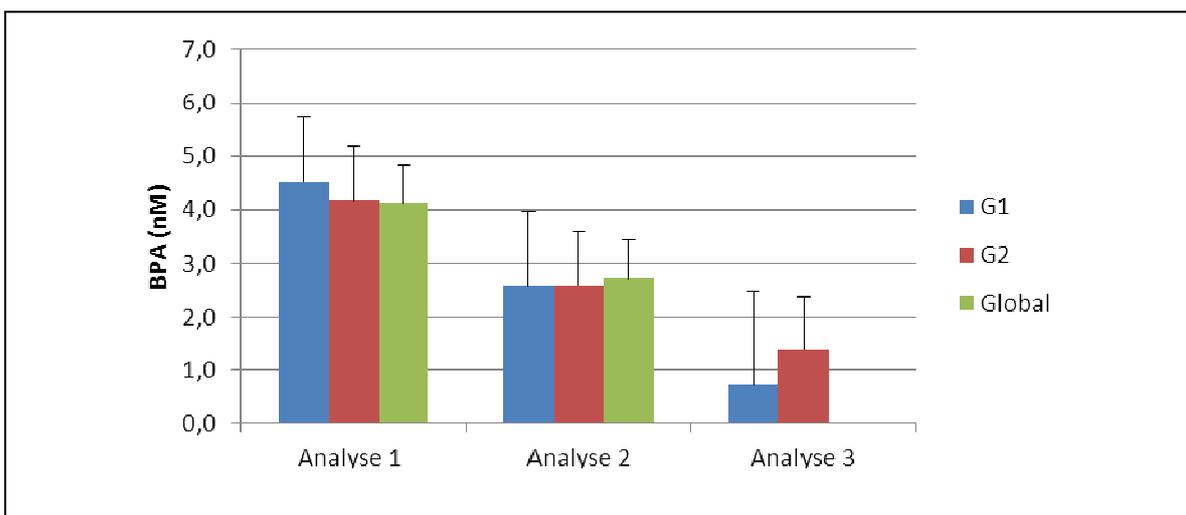


Figure 13 : Variation de la concentration en BPA dans les milieux de culture au cours du temps (étude préliminaire). Le flacon de milieu était ouvert pour l'analyse 1, conservé à 4°C et réutilisé pour les analyses 2 et 3. La variation retrouvée n'était pas significative.

Cette expérimentation a permis de mettre un place un protocole de dosage du BPA dans deux milieux utilisés en routine en FIV. Cependant, nous avons dosé le BPA dans seulement un lot de chaque milieu et sans se préoccuper des délais entre les dosages et la dates de fabrication. A posteriori, ces délais nous ont parus importants puisqu'on observe une diminution du BPA au cours du temps qui entraine une forte variabilité des dosages dans les conditionnements commerciaux et en condition de culture en FIV,

Devant ces résultats, il nous a été impossible de conclure à une contamination des milieux étudiés par le BPA. Ainsi, cette étude préliminaire nous a incités à rechercher la présence de BPA au sein de divers milieux, sur plusieurs lots par milieu et à des dates post fabrication identiques.

1.6. OBJECTIFS DE L'ETUDE :

Les embryons, au stade préimplantatoire, sont complètement sortis de leur milieu naturel de développement au cours d'une FIV. Bien que les milieux et les conditions de cultures essaient de reconstituer le plus possible les conditions naturelles de croissance des embryons, il est certain qu'ils ne sont pas optimaux. Ainsi, malgré sa fragilité, l'embryon est soumis à des agressions extérieures auquel il n'est pas préparé. L'exemple des altérations de la régulation épigénétique en est une preuve. Il devient alors important d'identifier les substances qui pourraient être délétères pour les embryons voir pour les enfants à venir.

Le BPA étant potentiellement nocif pour les embryons et puisqu'il est très répandu dans l'environnement, il nous est paru important de détecter sa présence dans les milieux utilisés en routine pour la culture embryonnaire humaine.

Nous avons voulu évaluer les milieux dans leur conditionnement commerciaux et regarder la cinétique du BPA au cours du temps dans des flacons fermés tout au long de leur durée de stockage.

Par la même occasion, nous avons cherché à détecter une potentielle contamination par du BPA au cours des différentes étapes de la FIV :

- via le matériel utilisé en routine en FIV (de la ponction au transfert, en passant par la congélation).
- en mimant au plus près les conditions de culture embryonnaire utilisées en routine (culture en microgoutte et incubation des milieux sous huile à 37°C et 6% de CO₂.)
- tout en faisant varier les suppléments protéiniques utilisées en routine :
 - HSA.
 - HSA recombinante.
 - Substitut de sérum.

2. MATERIELS ET METHODES :

2.1. LES MILIEUX DE CULTURE ETUDIES :

Nous avons voulu essayer de balayer la plupart des milieux de culture embryonnaire utilisés en routine dans le monde. Nous avons donc choisi 4 milieux commercialisés et utilisés par beaucoup de laboratoires d'AMP dans le monde : 2 milieux uniques et 1 milieu séquentiel.

2.1.1. Milieux uniques :

Les milieux uniques sont utilisés pour la culture embryonnaire depuis la fécondation jusqu'au stade blastocyste. Nous avons choisi de doser le BPA dans le milieu Global®, commercialisé par LifeGlobal® ainsi que le Continuous Single Culture™ Media, commercialisé par Irvine Scientific®.

- **le milieu Global®** permet à l'embryon de se développer jusqu'au stade blastocyste. Il contient tous les éléments nécessaires à sa croissance depuis le début. C'est l'embryon qui va « choisir » les métabolites qu'il va utiliser en fonction de son stade de développement. Pour une culture embryonnaire jusqu'à J3, le milieu n'est pas changé. Si on veut continuer sa culture jusqu'à J5 ou J6, on change l'embryon de milieu à J3. Ainsi, l'embryon ne subit pas de « choc » lié à la modification du milieu. Le travail au laboratoire est allégé et permet une diminution du risque d'erreur.
- **Le milieu Continuous Single Culture™** est basé sur le même principe que le milieu Global®. Son concept de fabrication permet la culture de l'embryon jusqu'au stade blastocyste sans jamais changer le milieu. L'embryon n'est pas du tout soumis à des variations de pH ou de température et donc aurait une capacité d'atteindre le stade blastocyste plus importante que pour un milieu séquentiel.

Ces deux milieux ne sont pas supplémentés en macromolécules. Il convient donc d'en ajouter au moment de la préparation du milieu. Il existe différentes possibilités de supplémentation (cf paragraphe 2.1.3).

2.1.2. Milieu séquentiel :

Nous avons testé un milieu séquentiel : **ISM1™ / BlastAssist® (Origio®)**.

Ils sont conçus pour imiter le microenvironnement et abaisser le stress de la culture in vitro causé à l'embryon. Ils contiennent du glucose et ses dérivés métaboliques, des acides aminés, des nucléotides, des vitamines et du cholestérol. L'ISM1 possède aussi de la S-Adénosyl Méthionine, la source principale de méthionine utilisée pour la méthylation de l'ADN lors du développement embryonnaire préimplantatoire. Les milieux sont changés tous les jours ou tous les deux jours en fonction des équipes. Ils sont déjà supplémentés par de l'HSA pour l'ISM1™ et en HSA + Un sérum synthétique de remplacement (SSR®) pour BlastAssist®.

2.1.3. Supplémentation protéinique :

Pour la supplémentation protéinique, nous avons également voulu étudier les sources de macromolécules commercialisées par les fournisseurs de nos milieux :

- **HSA® (LifeGlobal®), Albumine Sérique Humaine** purifiée à partir de sang de donneurs.
- **SSS® (IrvineScientific®), Sérum Substitute Supplément** : il s'agit d'un supplément protéinique stérilisé par filtration contenant 6 % de protéines humaines (84% d'albumine, 16% de α et β globuline, moins de 1% de γ globuline).
- **G-MM™ (VitroLife®)**, qui est une Albumine Humaine Recombinante.

2.2. PROTOCOLE D'EVALUATION DES MILIEUX DE CULTURE ETUDIES :

2.2.1. Contrôle du matériel utilisé :

Avant toute expérimentation, nous avons voulu tester le matériel qui allait être utilisé afin de nous assurer de l'absence de diffusion de BPA depuis les différents plastiques.

Dans les semaines précédant les commandes de milieux de culture, nous avons contrôlé tout le matériel nécessaire pour mener les expérimentations :

- Les boîtes de cultures 4 puits (nunc®).
- Les embouts de pipettes.

- Les cryotubes (nunc®).

Nous en avons aussi profité pour évaluer tout les réceptacles et tubulures en contact direct avec les gamètes ou les embryons au cours d'une FIV :

- Les réceptacles pour le sperme (Clinisperm®),
- La tubulure de ponction,
- Les tubes à hémolyse utilisés pour la récupération du liquide folliculaire,
- Les boîtes de pétri (nunc®) utilisées pour récupérer les ovocytes,
- Les cathéters de transfert.
- Les paillettes de congélation.

Nous avons dosé le BPA sur 3 échantillons de chaque type de matériel.

Les tubes, boîtes et réceptacles étaient remplis avec une solution composée de 50% d'acétonitrile (AcN) et 50% d'eau. Les tubulures, cathéters et embouts de pipettes et les paillettes étaient baignés dans cette même solution. Après une incubation de 1 heure, à 37°C, nous avons dosé le BPA.

L'acétonitrile est un solvant du BPA, utilisé aussi comme phase mobile pour la technique de chromatographie liquide de notre étude. La forte affinité du BPA pour ce solvant garanti un dépistage optimal du BPA dans les plastiques. Si du BPA est présent dans l'échantillon analysé, il passera dans la solution d'AcN/H₂O et pourra alors être dosé.

2.2.2. Dépistage du Bisphénol A dans les conditionnements commerciaux :

Nous avons testé 3 lots de chaque milieu et 3 flacons par lot. Puisque lors de notre étude préliminaire nous avons noté une tendance à la baisse de la concentration de BPA au cours du temps nous avons commandé des milieux très récents afin de pouvoir débiter les dosages du BPA 3 ou 4 semaines après la fabrication. Les fournisseurs nous envoyaient les flacons de milieux dès qu'ils étaient « libérés », c'est-à-dire après avoir validé les tests d'embryo-toxicité et de stérilité.

Trois ou quatre semaines après leur fabrication, le premier flacon était ouvert et nous prélevions 2 fois 100µl de milieu que nous congelions dans deux cryotubes à -80°C afin de faire les dosages en duplicata. Cette opération était renouvelée à 5 et à 7 semaines. Les

flacons étaient maintenus fermés et conservé à 4°C. Ils étaient ouverts au moment de l'expérimentation et n'étaient pas réutilisés après ouverture comme la plupart des fournisseurs le conseille.

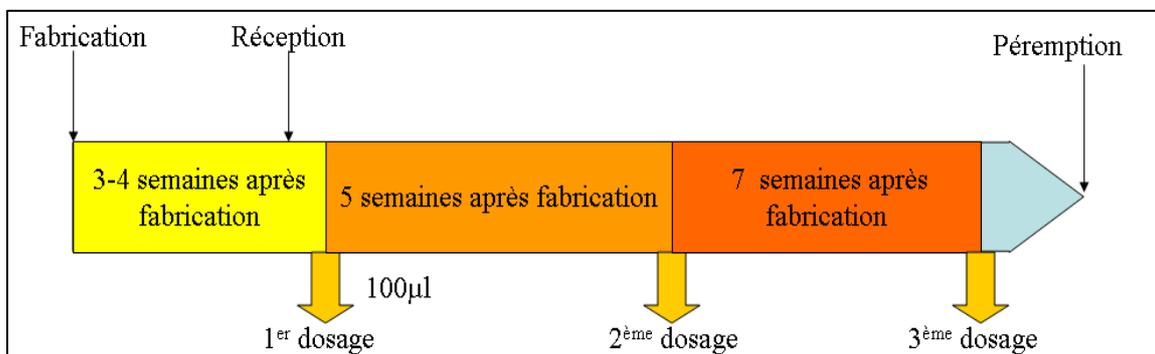


Figure 15 : Représentation schématique du protocole de dépistage du BPA dans les conditionnements commerciaux des milieux de culture étudiés.

2.2.3. Evaluation de l'effet des conditions de culture en FIV sur la concentration du Bisphénol A dans les milieux de culture :

Pour chaque lot, 3 ou 4 semaines après fabrication, les milieux étaient disposés sous forme de microgouttes de 50µl dans les boites de culture 4 puits que nous utilisons en routine au laboratoire et recouvert d'huile minérale Ferticult®. Les milieux sans protéines étaient supplémentés comme spécifié par le fournisseur. C'était le cas du milieu Global® (LifeGlobal®) que nous avons supplémenté avec 5 % de HSA® (LifeGlobal®), et du milieu CSC® (Irvine Scientific®) auquel a été ajouté 10% de SSS® (Irvine Scientific®).

Les boites étaient ensuite placées dans une étuve à 37°C et sous 6% de CO₂. Après une incubation de 48 heures : nous prélevons deux gouttes de 50µl que nous disposions dans deux cryotubes à -80°C. Le milieu CSC® pouvant être utilisé jusqu'à 5 à 6 jours sans changement, nous avons laissé incuber le milieu jusqu'à 96 heures en prélevant des microgouttes à 48 heures et à 96 heures

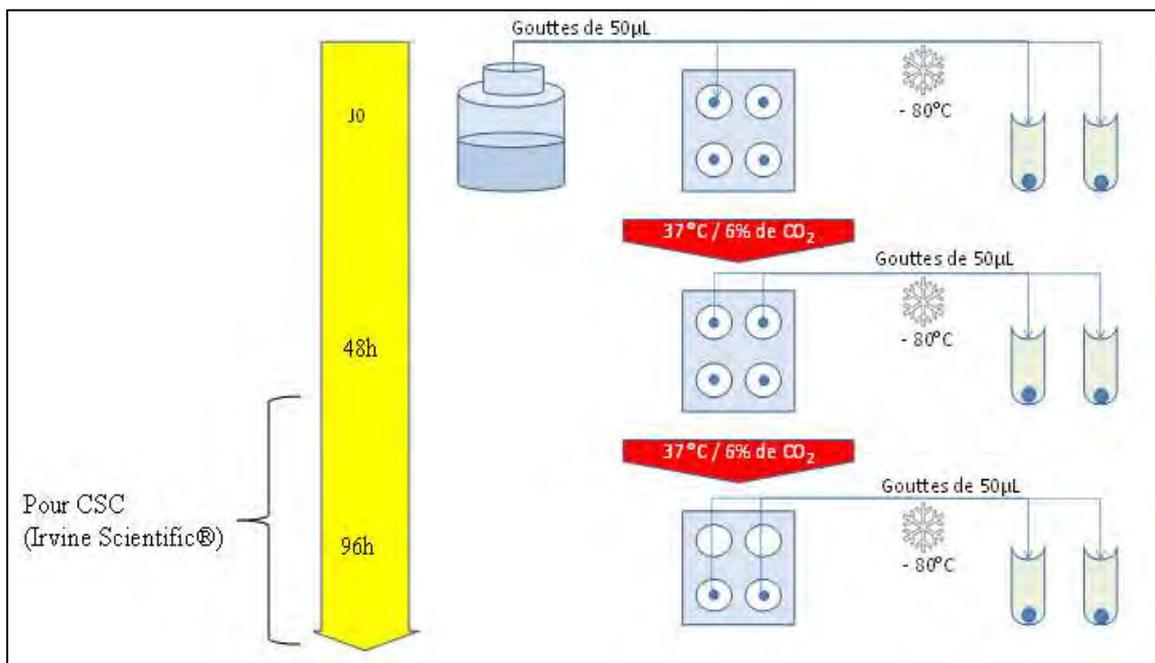


Figure 16 : Représentation schématique du protocole de dépistage du BPA dans les milieux de culture utilisés dans les conditions d'une FIV.

2.2.4. Evaluation de l'effet de différents types de supplémentation protéinique sur la concentration du bisphénol A dans les milieux de culture :

Dans l'étude de Tatakori et al 2012 (44), des phtalates avaient été retrouvés dans les substituts de sérum. Nous avons voulu évaluer plusieurs substituts de sérum utilisés en routine : HSA® (LifeGlobal®), SSS® (Irvine Scientific®) et une HSA recombinante G-MM™ (VitroLife®).

Les substituts de sérums étaient dilués dans les proportions spécifiées par les fournisseurs :

- 5% de HSA® dans du milieu Global®,
- 5% de G-MM™ dans du milieu Global®,
- 10% de SSS® dans le CSC®.

Les mélanges étaient ensuite placés dans les cryotubes et congelés à -80°C en vue du dosage.

Pour des raisons financières, nous n'avons évalué qu'un lot de chaque substitut de sérum.

2.3. METHODE DE DOSAGE DU BISPHENOL A :

2.3.1. Principe de la technique utilisée :

Le dosage du BPA a été réalisé par chromatographie en phase liquide à ultra haute performance couplée à une spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS) [89].

Le principe de séparation repose sur l'interaction des solutés (ici le bisphénol A) entre deux phases non miscibles : la phase mobile (mélange de solvant) et la phase stationnaire (colonne chromatographique). L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelé phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie.

L'UPLC est une amélioration de la technique de l'HPLC (High performance liquid chromatography). C'est un système chromatographique permettant le travail à très forte pression associé à l'utilisation d'une colonne de chromatographie de fine granulométrie (<2µm). La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. En effet, pour un même volume de phase stationnaire, la surface d'échange augmente si les «grains» qui la composent sont de diamètre plus petit. Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée ainsi que les seuils de détection.

Les composants, une fois séparés, sont analysés et quantifiés par spectrométrie de masse. Cette technique consiste à détecter des molécules en fonction du rapport de leur masse sur leur charge (m/z). En sortie de colonne d'UPLC, les molécules sont ionisées dans une source d'ionisation puis séparées dans un ou des analyseurs en fonction du rapport m/z .

Il existe plusieurs types de source d'ionisation et d'analyseurs : pour le dosage du BPA, la source d'ionisation est un electrospray en mode négatif (ESI⁻).

L'analyseur est un triple quadripôle. Les quadripôles sont formés de quatre électrodes (deux positives et deux négatives). Différents potentiels sont appliqués sur les électrodes afin de permettre le passage de l'ion d'intérêt, les autres molécules sont neutralisées au contact des électrodes. La quantification du BPA est réalisée par « MRM » (Multiple Reaction Monitoring) : après ionisation, l'ion « père » du BPA est sélectionné dans le premier quadripôle (Q1) puis fragmenté à l'aide d'un gaz (l'argon) dans le second

quadripôle (Q2) (cellule de collision). Un ion « fils » issu de la fragmentation est ensuite sélectionné dans le dernier quadripôle (Q3).

Cette méthode permet d'être très sélectif et par conséquent d'augmenter les seuils de détection.

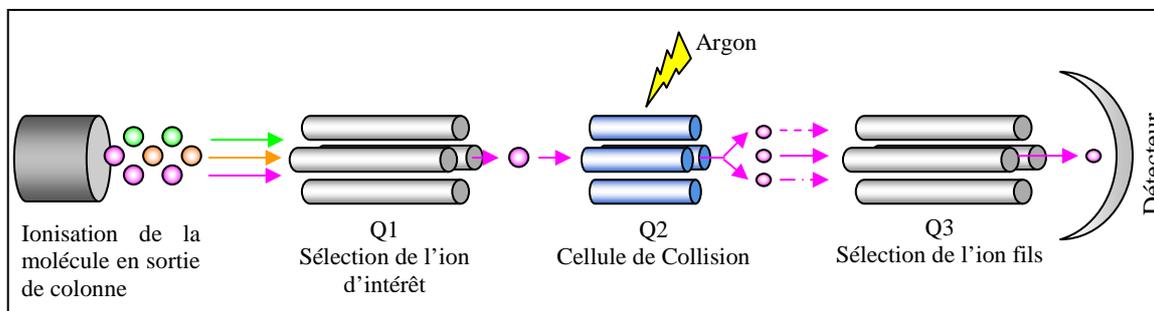


Figure 17 : Principe de la spectrométrie de masse en tandem.

2.3.2. Préparation des échantillons :

Les échantillons avaient un volume variable en fonction de l'expérimentation réalisée. En effet, la plupart avaient un volume de 100 μ L cependant quelques prélèvements issus des microgouttes de 50 μ L mesuraient un peu moins de 50 μ L. Il a donc été nécessaire d'adapter la technique de dosage à ces petits volumes.

Pour les échantillons dont le volume était inférieur à 100 μ L, le volume a été réajusté à 100 μ L avec un mélange AcN/H₂O (50/50) de façon à ce que tous les échantillons subissent la même préparation avant injection.

Ensuite, 50 μ L de standard interne (BPA-d16 à 1 μ g/mL dilué dans 50% d'AcN et 50% d'H₂O) ont été ajoutés au 100 μ L d'échantillon avec 150 μ L d'AcN. Le mélange est agité durant 10 secondes et centrifugé 10 minutes à 20000g et 4°C.

Le standard interne est un composé isotopique du BPA possédant les mêmes propriétés physico-chimiques, les temps de rétention de ces deux composés seront donc identiques ; seule la détection par la spectrométrie de masse permettra de les différencier. Ce standard interne permettra de s'assurer de la bonne qualité de l'extraction du BPA des milieux et par conséquent une meilleure quantification.

2.3.3. Mesure :

Cinq microlitres d'échantillon préalablement extrait ont été injecté sur une chaîne Acquity UPLC® couplée à un spectromètre de masse triple quadripôles Xevo® (Waters, Milford, MA, USA.). Le BPA et le BPA-d16 ont été séparés du reste des constituants du milieu par la chromatographie liquide avec une colonne C18 (BEH Acquity, 100*3.0 mm; 1.7 µm, Waters) à un débit de 0.35mL/min et un gradient H₂O/AcN. En chromatographie liquide, le BPA et le BPA-d16 présentent des vitesses de migration identiques, c'est la spectrométrie de masse qui va ensuite les séparer. Les molécules sont ionisées avec une source electrospray (ESI) en mode négatif (OH est transformé en O⁻). Les ions passent ensuite dans les trois quadripôles :

- Le premier quadripôle sectionne les rapports masse/charge (m/z) du BPA (m/z = 227) et du BPA-d16 (m/z = 241). Différents potentiels sont appliqués sur les électrodes constituant le quadripôle de telle sorte que les ions d'intérêts soient les seuls à pouvoir traverser ces électrodes ; les autres ions sont neutralisés sur les électrodes.
- Le deuxième quadripôle fragmente les molécules par collision avec un gaz inerte (de l'Argon) : le BPA donne les ions fragments suivants m/z = 212 et m/z = 113 avec une énergie de collision de 20 et 28 eV respectivement. Le BPA-d16 donne les ions fragments suivants m/z = de 222 et m/z = 142 avec une énergie de collision de 30 et 32 eV, respectivement.
- Comme pour le premier quadripôle, le troisième, par un jeu de potentiels, va sélectionner les ions d'intérêts issus de la fragmentation de l'ion parent et les envoyer vers le détecteur.

Avec cette technique, la limite de quantification du BPA est de 0.5 ng/mL soit 2.19 nM.

2.4. TESTS STATISTIQUES UTILISES :

Nous avons utilisé le logiciel de statistique : SAS 9.3.

Les résultats rendus comme inférieurs à la limite de quantification (2.19nM) étaient considérés comme nuls et ramenés à 0nM.

Dans l'optique de répondre à notre première question : présence ou absence de BPA dans les milieux de culture, nous avons utilisé un test d'adéquation (test de la médiane) permettant de comparer les résultats des dosages par rapport au seuil de détection de l'analyse.

Afin d'évaluer l'impact de la durée de conservation, du temps d'incubation ou du type de substitut protéinique ajouté dans les milieux, nous avons utilisé un test non paramétrique apparié (test de Wilcoxon). Ce test permet de comparer deux mesures d'une variable quantitative effectuées sur les mêmes sujets (mesures définies par les modalités de la variable qualitative).

Nous considérons comme statistiquement significatif, un $p < 0,05$.

3. RESULTATS :

3.1. CONTROLE DU MATERIEL UTILISE :

3.1.1. Matériel utilisé au cours de notre expérimentation :

Comme attendu, nous n'avons pas retrouvé de BPA ni dans les cryotubes ni dans les embouts de pipettes utilisés, ces deux produits étant en polypropylène donc sans BPA.

	BPA (nM)		
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
Cryotubes	0	0	0
Embouts de pipettes	0	0	0
Boites de culture (nunc®)	0	8,8	0

Tableau 4 : BPA (nM) dans le matériel utilisé pour notre expérimentation,

Dans les boites de culture, nous avons retrouvé du BPA dans un des échantillons, à une concentration de 8.8nM. Afin de vérifier que cette contamination soit accidentelle, nous avons réitéré l'expérimentation sur 12 boites (4 boites de 3 lots différents). Du BPA a été dosé dans seulement une seule boite, à une concentration de 8.28 nM. Cette valeur est considérée comme aberrante si on utilise le test de Grubbs ($p < 0.01$). Nous pouvons donc conclure à l'absence de contamination par le BPA dans les boites de cultures.

Boites de culture	lot 1	lot 2	lot 3
	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	8,28(NS)	< LOQ	< LOQ

Tableau 5 : BPA (nM) dans les boites de culture embryonnaire, évaluation de 3 lots.
NS : non significatif (test de Grubbs).

3.1.2. Matériel utilisé en routine dans le laboratoire de FIV du CHU de Toulouse :

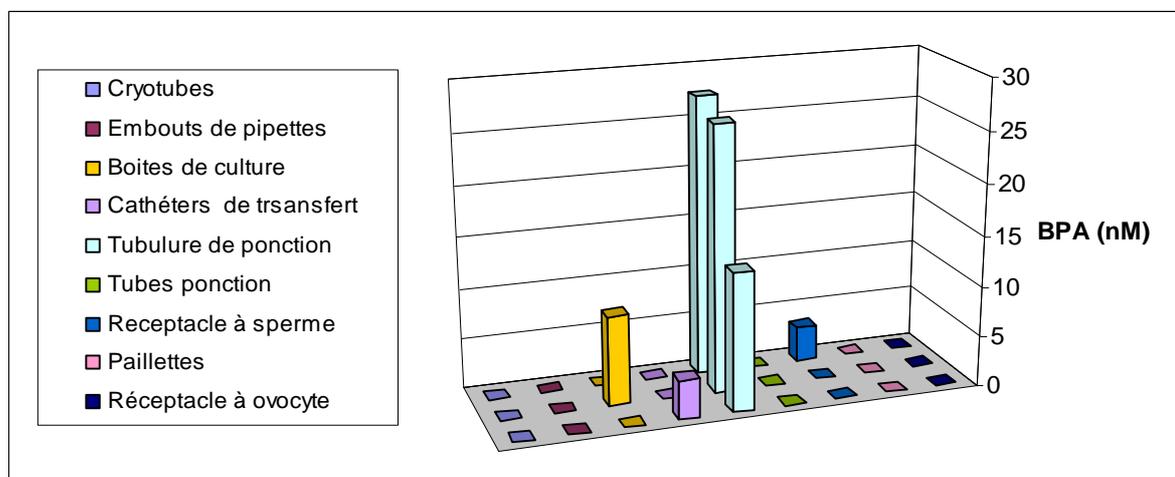


Figure18 : BPA (nM) dans le matériel utilisé en routine au cours d'une FIV au laboratoire d'AMP du CHU de Toulouse.

Le taux de BPA retrouvé après incubation d'une heure de tubulures de ponctions dans de l'acétonitrile, variait entre 13 à 27 nM pour les trois dosages. Cette détection a été contrôlée dans les conditions d'utilisation standard de la tubulure afin de connaître la concentration exacte de BPA à laquelle les ovocytes pourraient être exposés au cours de la ponction. Nous avons testé trois tubulures de ponction de trois lots différents (9 au total). Pour être au plus proche des conditions de ponction ovocytaire, nous avons suivi le protocole utilisé dans notre laboratoire. La veille d'une ponction ovocytaire, nous mettions 2 tubes de 5mL de milieu de rinçage des ovocytes à l'étuve (37°C et 6% de CO₂). La tubulure de ponction était également mise dans une étuve à 37° dans les salles de ponction. Le lendemain, juste avant de débuter une ponction chez les patientes, nous faisons passer dans la tubulure les 5mL de liquide de rinçage des ovocytes. Le liquide était récupéré puis congelé en vue du dosage de BPA. Afin de s'assurer de l'absence de BPA dans le milieu de rinçage des ovocytes le deuxième tube de 5mL servait de témoin.

Nous n'avons pas retrouvé de BPA de manière significative dans le liquide de rinçage des ovocytes. En revanche, la concentration retrouvée (3.77nM +/-1.71) après passage du liquide dans la tubulure de ponction était statistiquement supérieure à la limite de quantification (p<0.05). Cependant, la légère différence de concentration observée avant ou après passage du liquide dans la tubulure n'était pas significative.

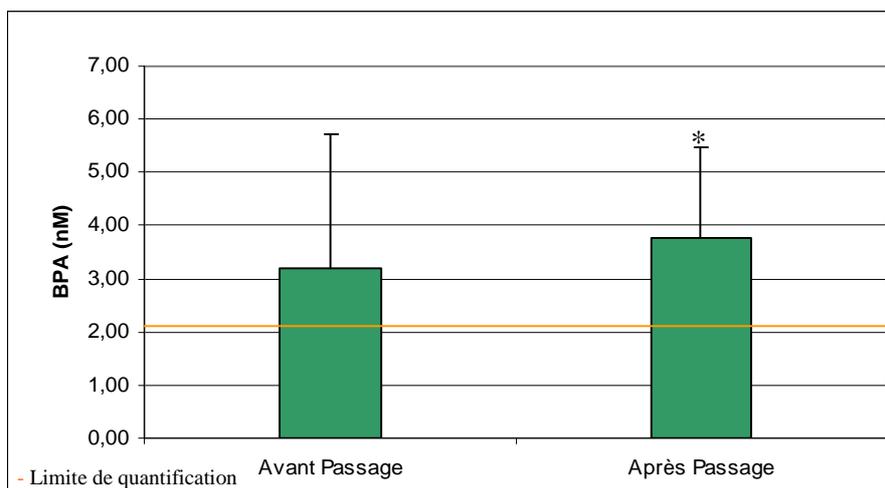


Figure 19: BPA (nM) dans les tubulures de ponctions utilisées dans les conditions de ponction du laboratoire du CHU de Toulouse.
 * : Dosage du BPA statistiquement supérieur au seuil de détection ($p < 0.05$), test de la médiane.

3.2. DEPISTAGE DU BISPENOL A DANS LES CONDITIONNEMENTS COMMERCIAUX :

Nous avons détecté du BPA dans trois des milieux de culture que nous avons étudié, les résultats sont décrits dans le tableau 6. En effet, nous retrouvons des doses de BPA statistiquement supérieures à la limite de quantification pour le milieu ISM1TM, le BlastAssist® et le CSC®. Seul le milieu Global®, présenterait un taux de BPA inférieur à la limite de quantification (non significatif).

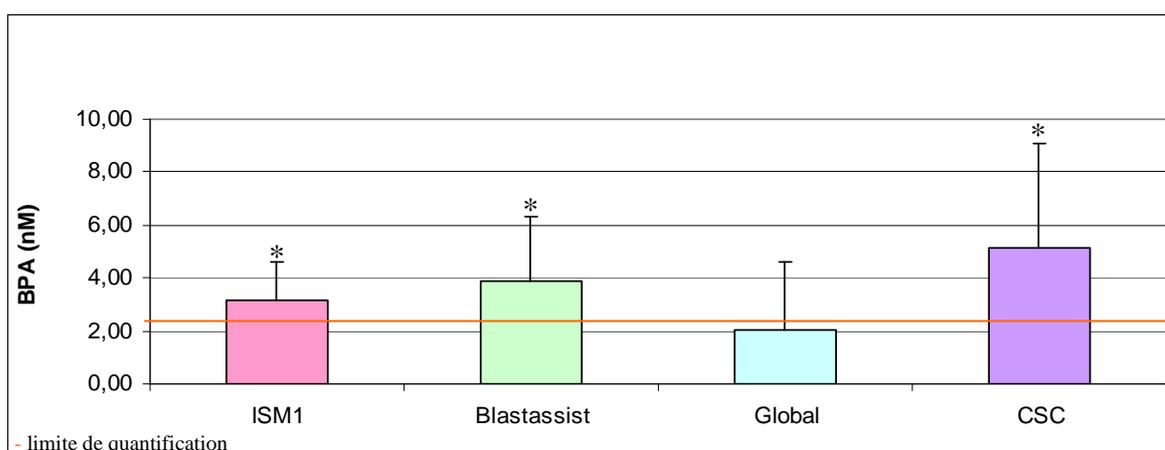


Figure 20: BPA dans les milieux de culture utilisés en routine chez l'Homme.
 * : Dosage de BPA statistiquement supérieur au seuil de détection (Test de d'adéquation : $p < 0,05$).

	ISM1™		BlastAssist®		Global®		CSC®	
	Moyenne	(+/- ET)	Moyenne	(+/- ET)	Moyenne	(+/- ET)	Moyenne	(+/-ET)
Lot 1	2,81	+/- 1,53	3,18	+/- 2,67	2,07	+/- 2,48	5,70	+/- 6,10
Lot 2	2,96	+/- 0,71	3,33	+/- 0,81	2,10	+/- 2,45	4,74	+/- 1,14
Lot 3	3,39	+/- 1,93	5,49	+/- 3,06	1,59	+/- 2,73	5,29	+/- 3,52
Moyenne (nM)	3,19	+/- 1,40	3,89	+/- 2,40	2,32	+/- 2,80	5,17	+/- 3,91

Tableau 6 : BPA (nM) dans les milieux de culture embryonnaire utilisés en routine chez l'homme.

3.3. CINÉTIQUE DE LA CONCENTRATION DU BISPHENOL A DANS LES CONDITIONNEMENTS COMMERCIAUX :

Lors de notre étude préliminaire, nous avons observé une diminution des concentrations du BPA au cours du temps, ces résultats n'étant pas significatifs nous avons réitéré l'expérience. Si nous comparons les concentrations du BPA en fonction de la durée de stockage des milieux dans leur conditionnement d'origine, nous ne retrouvons pas de différence significative (Figure 21).

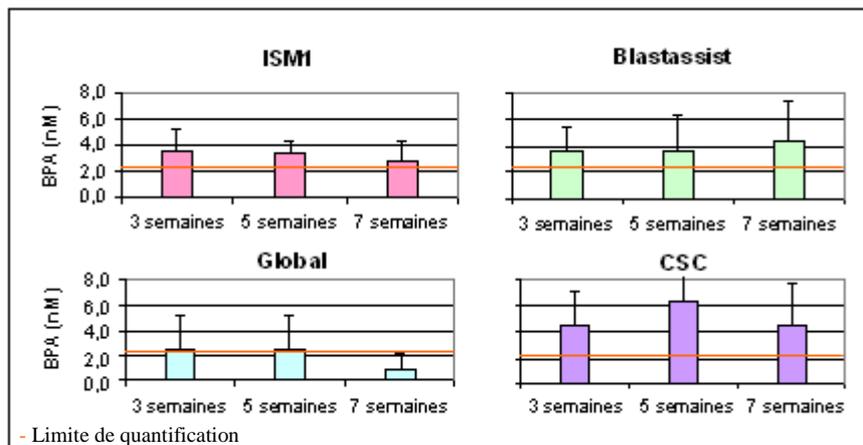


Figure 21: BPA dans les conditionnements commerciaux, cinétique dans le temps.

3.4. EVALUATION DE L'EFFET DES CONDITIONS DE CULTURE EN FIV SUR LA CONCENTRATION DU BISPHENOL A DANS LES MILIEUX DE CULTURE :

Employés dans les conditions de culture embryonnaire en FIV, les milieux ISM1TM, BlastAssist® et CSC® voient leur niveau de BPA sensiblement augmenter (résultats décrits dans le tableau 7). Le milieu Global® n'est pas soumis à ce phénomène. La différence observée pour le milieu BlastAssist est limite ($p=0,05$), elle n'est pas significative pour les autres milieux.

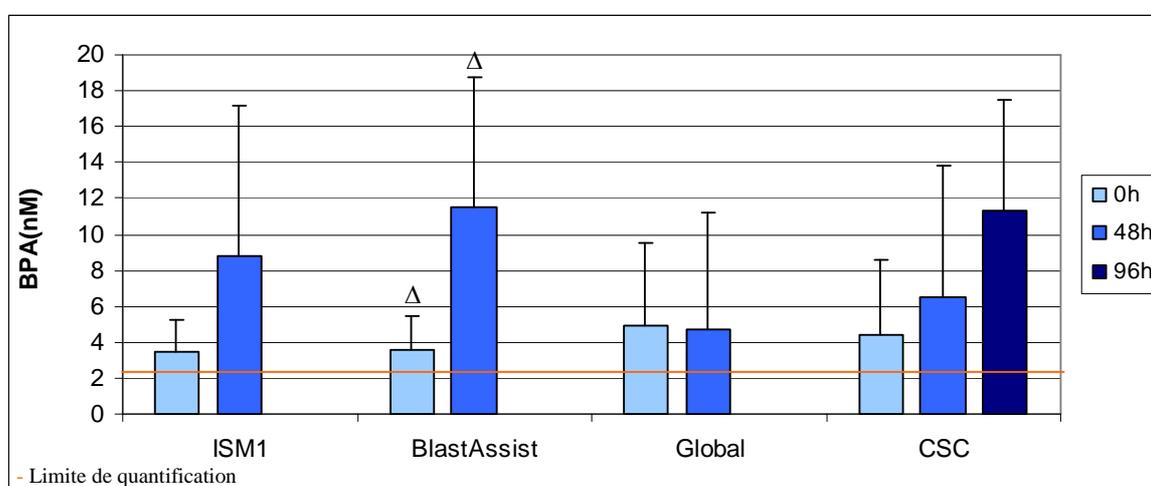


Figure 22: BPA (nM) dans les milieux utilisés en condition de FIV.
 Δ : différence limite ($p=0.05$), test de Wilcoxon.

	ISM1 TM (+/- ET)	BlastAssist® (+/- ET)	Global® (+/- ET)	CSC® (+/- ET)
0h	3,41 (+/- 1,83)	3,58 (+/- 1,86)	4,93 (+/- 4,60)	4,39 (+/-4,19)
48h	8,8 (+/- 8,33)	11.52 (+/- 7.21)	4,74 (+/- 6,47)	6,5 (+/-7,30)
96h	non fait	non fait	non fait	11,34 (+/-6,20)

Tableau 7: BPA (nM) dans les milieux utilisés en condition de FIV.

3.5. EVALUATION DU L'EFFET DE DIFFERENTS TYPES DE SUPPLEMENTATION PROTEINIQUE SUR LA CONCENTRATION DE BISPHENOL A DANS LES MILIEUX DE CULTURE :

Les concentrations de BPA retrouvées dans les milieux avant et après supplémentation sont décrites dans le tableau 8. Nous ne trouvons pas de différence significative pour toutes les sources de macromolécules étudiées. Il n'y en a pas non plus entre du milieu Global additionné de HSA purifiée ou recombinante.

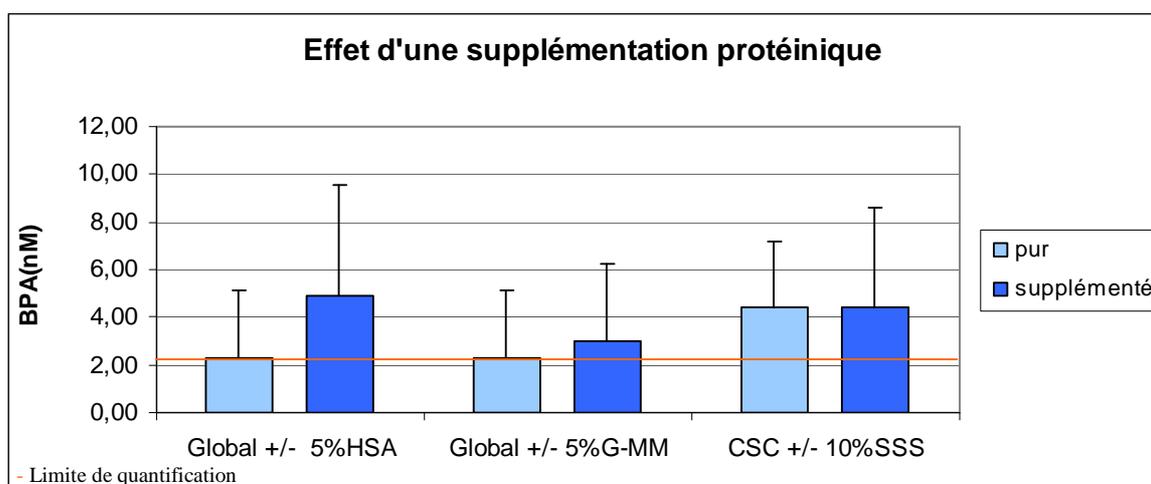


Figure 23: Effets d'une supplémentation protéinique sur le dosage de BPA dans les milieux de culture.

	Global +/- 5%HSA		Global +/- 5%G-MM		CSC +/- 10%SSS	
	Moyenne	+/- ET	Moyenne	+/- ET	Moyenne	+/- ET
pur	2,32	+/- 2,8	2,32	+/- 2,8	4,45	+/- 2,7
supplémenté	4,93	+/- 4,6	2,97	+/- 3,28	4,39	+/- 4,19

Tableau 8 : Effets d'une supplémentation protéinique sur le dosage de BPA dans les milieux de culture.

4. DISCUSSION ET CONCLUSION :

Le BPA est l'un des perturbateurs endocriniens les plus ubiquitaires. A la lumière des diverses études réalisées sur la contamination de notre environnement par le BPA et notamment sur la possible implication des dispositifs médicaux dans l'exposition de nouveaux-nés hospitalisés en réanimation néonatale, il nous a semblé important d'évaluer si, lors d'une tentative d'AMP, des sources d'exposition au BPA existaient. Nous avons testé l'ensemble des consommables plastiques utilisés lors d'une tentative de FIV au CHU de Toulouse, ainsi que différents milieux de cultures embryonnaires utilisés en routine.

Concernant les différents consommables utilisés pour une FIV dans notre centre, lorsque les tubulures des aiguilles de ponction ovocytaire sont exposées 1 heure à une solution d'AcN pour extraction du BPA, des niveaux de l'ordre de 20 nM de BPA sont retrouvés. Les tubulures de ponctions contiennent donc du BPA. Lorsqu'on les soumet cette fois-ci à leurs conditions d'utilisation standard par le passage du liquide de recueil ovocytaire (ne contenant pas de BPA significativement détectable), du BPA est significativement retrouvé à un niveau faible, de l'ordre de 3nM. Ainsi, la toute première étape de la FIV, la ponction ovocytaire, semble être une première source d'exposition au BPA.

Concernant l'étape de culture embryonnaire, notre étude montre que, parmi les quatre milieux que nous avons analysés dans leur conditionnement commercial, trois contiennent du BPA à des concentrations supérieures à 2 nM qui sont potentiellement nocives pour les embryons de mammifères.

Dans ces milieux, le BPA peut provenir de plusieurs sources. On pense en premier lieu aux flacons de stockage. Cependant, ils sont en PETG (Polyéthylène téréphtalate glycolisé), ce plastique n'est pas connu pour contenir du BPA. De plus, puisque la durée de stockage des milieux dans leur flacon d'origine ne fait pas varier le BPA de manière significative, on peut conclure qu'il n'y a pas de diffusion du BPA depuis les flacons. Pour s'en assurer complètement, il faudrait soumettre des flacons vierges à l'extraction pour l'AcN. Cela n'a pas pu être réalisé.

C'est donc plus probablement le processus de fabrication du milieu qui semble être à l'origine de cette contamination. Malheureusement, si les composés des milieux sont généralement connus, leur méthode de synthèse et leur conditionnement peuvent varier en fonction des fournisseurs et sont peu accessibles. De plus, une fois ces composés réceptionnés, les méthodes de synthèse des milieux de culture restent secrètes. S'il s'avère que le BPA provient de leur méthode de conception, il conviendrait d'analyser toute la chaîne de production de chaque milieu pour trouver l'origine de la contamination et l'éradiquer.

De même la majorité du matériel utilisé pour la culture embryonnaire étant en plastique, une diffusion du BPA vers les milieux pendant les manipulations est envisageable. Lors de nos expérimentations, nous avons pu observer que la concentration de BPA n'augmentait pas significativement après une incubation de 48 à 96 heures pour 3 des 4 milieux. Toutefois, on se rapproche très fortement de la significativité ($p=0.05$) pour le milieu BlastAssist®. Il est difficile d'expliquer ce résultat. On peut en tous les cas constater, d'après la liste des composés entrant dans la constitution du BlastAssist® fournie par le fabricant, qu'une particularité de ce milieu tient en sa richesse en vitamines (biotine, acide folique, niacinamide, pyridoxine, riboflavine, thiamine) qui ne figurent pas dans le milieu ISM1 du même fabricant. D'autre part, la source macromoléculaire du BlastAssist® est un sérum synthétique de remplacement associé à de l'HSA, alors qu'il s'agit d'HSA pour l'ISM1™.

L'origine de cette contamination en cours de culture reste difficile à élucider puisqu'on ne retrouve pas de BPA ni dans les boîtes de cultures ni dans les embouts de pipette. Là aussi, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Le BPA pourrait provenir de l'huile minérale et diffuser dans le milieu au cours de l'incubation. Il sera nécessaire de détecter le BPA dans les huiles minérales commercialisées. Ou bien il serait déjà présent dans le milieu mais indosable car séquestré par les protéines du milieu qui le relâcheraient pendant une incubation de longue durée à température élevée. Une étude montre que le BPA possède une affinité pour l'albumine humaine recombinante [90] Il se fixe dans une poche hydrophobe de l'albumine (dans le domaine IIA) par des liaisons chimiques faibles (liaisons hydrophobes et ponts hydrogènes). Ainsi, avant de laisser incuber le milieu à 37°, une partie de BPA serait lié à l'albumine, puis au cours de l'incubation, le temps et la

chaleur aidant, il se détacherait de la protéine et deviendrait dosable. Les HSA utilisées par chaque fabricant de milieux leur sont spécifiques. La source de collecte des sera humains peut différer et potentiellement influencer sur sa contenance en BPA.

Ainsi et puisqu'une étude avait retrouvé la présence de phtalates [85] dans certains substituts protéiniques, nous avons voulu nous assurer de l'absence de BPA dans plusieurs types de substituts : albumine sérique humaine purifiée, sérum purifié et albumine humaine recombinante. Nous n'avons pas retrouvé de modification significative de la concentration de BPA après l'ajout de ces macromolécules à nos milieux, aux concentrations préconisées par les fournisseurs et en l'absence d'incubation prolongée. Dans ces conditions, celles-ci ne paraissent pas être une source immédiate de BPA.

Bien que significatifs, les résultats des dosages du BPA restent très variables pour une condition donnée. Cette variabilité avait déjà été observée lors de notre étude préliminaire. Cela nous avait menés à modifier nos protocoles d'expérimentation. Nous avons été extrêmement attentifs aux risques de pollution externe par le BPA. Les paillasses, portoirs et pipettes étaient systématiquement décontaminés avec de l'alcool. Pour limiter les sources de variation, la totalité des dosages à effectuer sur un milieu étaient réalisés au cours d'une même série d'analyse. Enfin, nous avons émis l'hypothèse d'une variation de la concentration du BPA dans le temps qui aurait pu expliquer ce phénomène ; les mesures réalisées dans notre étude ne montrent pas de différences significatives. La principale explication à cette variabilité paraît inhérente à la technique d'analyse utilisée. Bien que ce soit la technique de référence, nos résultats gravitent autour de sa limite de quantification. Dans cette zone, les variations sont notables sans trop avoir les moyens d'agir dessus.

Notre étude est la première à montrer la présence de BPA dans trois des milieux de culture embryonnaire que nous avons étudiés. La seule autre équipe qui ait cherché à détecter le BPA dans les milieux est l'équipe de Mahalingaiah [88] et n'a pas retrouvé de BPA ni dans les milieux ni dans le matériel testé.

Ils ont évalués d'autres milieux: Quinn's Advantage Fertilization (HTF) Medium (Sage®) Vitrolife G1.5v5 medium (Vitrolife ®) sur un seul lot et 52 jours après réception du milieu. Le BPA était dosé dans les conditionnements commerciaux et dans les conditions d'une FIV. Les volumes utilisés étaient de 3mL, il n'y avait pas d'huile minérale ajoutée. Le

matériel testé différait également de celui que nous avons étudié, tant pour les boîtes de culture que pour les tubulures de ponction. Ils ont utilisé le même principe de dosage que notre étude, avec une limite de quantification équivalente.

Loin de mettre en doute les conclusions de cette étude, il était un peu difficile d'extrapoler les résultats obtenus à l'ensemble des milieux de cultures disponibles sur le marché. Il semblerait que tous les milieux de cultures ne présentent pas les mêmes concentrations de BPA. Ainsi, il serait nécessaire de dépister la totalité des milieux commercialisés.

De même, il convient de rester très prudent pour le matériel utilisé en FIV. En effet la majorité ne paraît pas être une source de BPA mais à la vue des résultats obtenus pour nos tubulures de ponction, il semble nécessaire de réitérer ces analyses en améliorant le protocole. Le fait de trouver du BPA à des concentrations significatives après passage du liquide de rinçage des ovocytes dans la tubulure de ponction laisse penser que les ovocytes sont au contact du BPA dès la première étape de la FIV. L'origine du BPA retrouvée est certainement mixte (liquide de rinçage des ovocytes et tubulure de ponction). Il conviendra d'identifier la part de chacun dans cette contamination.

La présence de BPA dans les milieux de culture embryonnaire est préoccupante. Les embryons cultivés *in vitro* peuvent être exposés à des doses potentiellement néfastes pour leur développement. Aux concentrations retrouvées lors de notre étude ($>2\text{nM}$), l'équipe de Takai montre que le BPA interfère sur la croissance embryonnaire *in vitro* ; si les embryons sont réimplantés, on retrouve une légère augmentation du poids des progénitures au sevrage [78, 81]. Dès que la dose de BPA dépasse 10 nM, celui-ci semble ralentir la croissance embryonnaire et diminuer le nombre d'embryon atteignant le stade blastocyste [78, 79]. Une exposition *in vivo* à de telles doses de BPA semble générer les mêmes effets [73]. La physiopathologie n'est pas totalement élucidée mais paraît être d'origine épigénétique. D'autant plus que quelques études démontrent les effets néfastes du BPA sur la régulation épigénétique après une exposition, *in vivo*, autour de l'implantation embryonnaire [83-85].

La présence de ce perturbateur endocrinien dans les milieux de culture pourrait, au moins en partie, expliquer les anomalies épigénétiques retrouvées après culture embryonnaire[32], voire même la légère augmentation de l'incidence de pathologies d'origine épigénétique chez les enfants issus de FIV[37].

Cependant ces inquiétudes doivent être modérées. La plupart des études qui montrent un effet du BPA sur les embryons est réalisée avec une exposition maternelle au BPA durant les phases de fécondation et d'implantation. Il paraît indispensable de multiplier les investigations sur les effets du BPA lors de la culture *in vitro* des embryons animaux afin d'apprécier la réelle toxicité de ce perturbateur endocrinien dans ces conditions.

S'il s'avère que le BPA, présent à faible dose dans des milieux de culture embryonnaire, engendre des troubles épigénétiques pouvant être à l'origine des pathologies observées chez l'Homme, il sera nécessaire de prendre des mesures pour l'éliminer totalement des milieux utilisés.

De plus, les concentrations dosées restent dans le même ordre de grandeur que les taux de BPA détectés dans le sang, les urines ou le liquide folliculaire. Bien que nous ne connaissions pas exactement le degré d'exposition des embryons dans les trompes ou l'utérus, il semblerait que ceux-ci soient au contact de doses équivalentes de BPA. Il ne devrait donc pas y avoir de différence d'effet observé *in vivo* ou *in vitro*. En revanche, l'environnement de l'embryon n'est pas du tout le même. *In vivo*, le BPA est « dilué » au sein des sécrétions tubaires puis utérines, comprenant notamment diverses molécules qui pourraient jouer un rôle de transporteur du BPA, et au sein d'un environnement d'hormones différent, notamment en stéroïdes, qui, soit interagissent avec lui, lui conférant des propriétés différentes [48], soit le rendent complètement inactif par compétition (concentrations plus élevées), ce qui n'est pas le cas en culture *in vitro*. Ainsi, loin de leurs conditions optimales de croissance, les embryons pourraient être plus sensibles aux perturbateurs endocriniens.

D'après nos travaux, le bisphénol A semble présent dans certains milieux de culture embryonnaire. Sa toxicité sur les embryons n'est pas encore totalement avérée et nécessite d'autres investigations. Mais compte tenu de ses modes d'actions connus, et notamment

des perturbations épigénétiques retrouvés dans l'embryon post-implantatoire (les seules recherchées), il pourrait participer aux anomalies épigénétiques mises en évidence après culture in vitro. Par ailleurs, ce perturbateur endocrinien est le plus connu à ce jour mais il en existe beaucoup d'autres. Ainsi, une étude récente révèle que des plastiques « BPA free » présentent tout de même des propriétés estrogéno-mimétiques [91]. Malgré l'absence de BPA, ces plastiques doivent donc contenir d'autres perturbateurs endocriniens aux propriétés similaires. Il convient donc de continuer à identifier les substances susceptibles d'être toxiques pour l'embryon et de chercher à les détecter dans les conditions de culture embryonnaire humaine.

Professeur Louis BUJAN
Chef du Pôle Femme - Mère - Couple
Hôpital Paule de Viguier
330, avenue de Grande Bretagne
TSA 70034
31059 TOULOUSE Cedex 9

Toulouse le 02.10.13

Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
de Médecine de Rangueil

D. ROUË

ANNEXES :

LES MATIERES PLASTIQUES :

Matières Plastiques

 <p>01 PET</p>	<p>Polyéthylène téréphthalate</p>  <p>Eau embouteillée</p>	 <p>05 PP</p>	<p>Polypropylène</p>  <p>Bouchons boîtes hermétiques</p>
 <p>02 PE-HD</p>	<p>Polyéthylène haute densité</p>  <p>Flacons.</p>	 <p>06 PS</p>	<p>Polystyrène</p>  <p>Boîtes de culture emballage isolant</p>
 <p>03 PVC</p>	<p>Polychlorure de vinyle (assoupli par phtalates/ BPA)</p>  <p>Films étirables tubes PVC dispositifs médicaux</p>	 <p>07 O</p>	<p>Polycarbonate (BPA) / Résine epoxy, autres.</p>  <p>Biberons canettes boîtes de conserves</p>
 <p>04 PE-LD</p>	<p>Polyéthylène basse densité</p>  <p>sacs plastiques films emballages</p>		

DESCRIPTIF DES PROTOCOLES :

	Lot	date fabrication	date de péremption	1 ^{er} prélèvement	2 ^{ème} prélèvement	3 ^{ème} prélèvement
Global® LifeGlobal®	lot 1 130318U	18/03/2013	27/05/2013	16/14/2013 4 semaines	22/04/2013 5 semaines	06/05/2013 7 semaines
	lot 2 130520U	20/05/2013	29/07/2013	10/06/2013 3 semaines	24/06/2013 5 semaines	08/07/2013 7 semaines
	lot 3 130614U	14/06/2013	23/08/2013	08/07/2013 3 semaines + 48h	19/07/2013 5 semaines	02/08/2013 7 semaines

	Lot	date fabrication	date de péremption	1 ^{er} prélèvement	2 ^{ème} prélèvement	3 ^{ème} prélèvement
Continuous Single Culture™ Media (Irvine Scientific®)	lot 1 90164130302	07/03/2013	05/06/2013	05/04/2013 4 semaines	10/04/2013 5 semaines	24/04/2013 7 semaines
	lot 2 90164130403	19/04/2013	17/07/2013	17/05/2013 4 semaines	24/05/2013 5 semaines	04/06/2013 7 semaines
	lot 3 90216130504	31/05/2013	28/08/2013	28/06/2013 4 semaines	05/07/2013 5 semaines	19/07/2013 7 semaines

	Lot	date fabrication	date de péremption	1 ^{er} prélèvement	2 ^{ème} prélèvement	3 ^{ème} prélèvement
ISM1™ (Origio®)	lot 1 13060053	25/02/2013	02/09/2013	22/03/2013 3 semaines	01/04/2013 5 semaines	15/04/2013 7 semaines
	lot 2 13090049	12/03/2013	23/08/2013	06/04/2013 3 semaines	15/04/2013 5 semaines	29/04/2013 7 semaines
	lot 3 13150145	22/04/2013	04/10/2013	13/05/2013 3 semaines	27/05/2013 5 semaines	10/06/2013 7 semaines

	Lot	date fabrication	date de péremption	1 ^{er} prélèvement	2 ^{ème} prélèvement	3 ^{ème} prélèvement
BlastAssist® (origio®)	lot 1 13070219	06/03/2013	09/08/2013	26/03/2013 3 semaines	08/04/2013 5 semaines	22/04/2013 7 semaines
	lot 2 13100187	22/03/2013	30/08/2013	11/04/2013 3 semaines	25/04/2013 5 semaines	10/05/2013 7 semaines
	lot 3 13120783	09/04/2013	13/09/2013	30/04/2013 3 semaines	14/05/2013 5 semaines	28/05/2013 7 semaines

REFERENCES :

1. Cravedi, J.P., et al., *[The concept of endocrine disruption and human health]*. Med Sci (Paris), 2007. **23**(2): p. 198-204.
2. Anses, *Effets sanitaires du bisphénol A, rapport d'expertise*. 2011.
3. Anses, *Evaluation des risques du bisphénol A (BPA) pour la santé humaine*. 2013.
4. Inserm, *Bisphénol A. Effets sur la reproduction, rapport préliminaire*. . 2010.
5. Calafat, A.M., et al., *Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants*. Environ Health Perspect, 2009. **117**(4): p. 639-44.
6. Brown, J.J. and D.G. Whittingham, *The roles of pyruvate, lactate and glucose during preimplantation development of embryos from F1 hybrid mice in vitro*. Development, 1991. **112**(1): p. 99-105.
7. Houghton, F.D. and H.J. Leese, *Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2004. **115 Suppl 1**: p. S92-6.
8. Gardner, D.K. and M. Lane, *Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture*. Biol Reprod, 1993. **48**(2): p. 377-85.
9. Meintjes, M., et al., *A randomized controlled study of human serum albumin and serum substitute supplement as protein supplements for IVF culture and the effect on live birth rates*. Hum Reprod, 2009. **24**(4): p. 782-9.
10. Blake, D., et al., *Protein supplementation of human IVF culture media*. J Assist Reprod Genet, 2002. **19**(3): p. 137-43.
11. Bontekoe, S., et al., *Adherence compounds in embryo transfer media for assisted reproductive technologies*. Cochrane Database Syst Rev, (7): p. CD007421.
12. Lane, M. and D.K. Gardner, *Embryo culture medium: which is the best?* Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2007. **21**(1): p. 83-100.
13. Gardner, D.K., et al., *Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells*. Fertil Steril, 1996. **65**(2): p. 349-53.
14. Valbuena, D., et al., *Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo*. Fertil Steril, 2001. **76**(5): p. 962-8.
15. Marek, D., et al., *Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program*. Fertil Steril, 1999. **72**(6): p. 1035-40.
16. Glujovsky, D., et al., *Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology*. Cochrane Database Syst Rev, 2012. **7**: p. CD002118.
17. Biggers, J.D. and M.C. Summers, *Choosing a culture medium: making informed choices*. Fertil Steril, 2008. **90**(3): p. 473-83.
18. Basile, N., et al., *Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes*. Hum Reprod, 2013. **28**(3): p. 634-41.

19. Paternot, G., et al., *Early embryo development in a sequential versus single medium: a randomized study*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2010. **8**: p. 83.
20. Campo, Binda, and V. Kerkhoven, *Critical reappraisal of embryo quality as a predictive parameter for pregnancy outcome: a pilot study*. *F, V & V In ObGyn.*, 2010. **2**: p. 289-295.
21. Sepulveda, S., et al., *In vitro development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system*. *Fertil Steril*, 2009. **91**(5): p. 1765-70.
22. Eaton, J.L., et al., *Embryo culture media and neonatal birthweight following IVF*. *Hum Reprod*, 2012. **27**(2): p. 375-9.
23. Vergouw, C.G., et al., *The influence of the type of embryo culture medium on neonatal birthweight after single embryo transfer in IVF*. *Hum Reprod*, 2012. **27**(9): p. 2619-26.
24. Lin, S., et al., *No effect of embryo culture media on birthweight and length of newborns*. *Hum Reprod*, 2013. **28**(7): p. 1762-7.
25. Mantikou, E., et al., *Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review*. *Hum Reprod Update*, 2013. **19**(3): p. 210-20.
26. Reik, W., *Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development*. *Nature*, 2007. **447**(7143): p. 425-32.
27. Li, B., M. Carey, and J.L. Workman, *The role of chromatin during transcription*. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 707-19.
28. Kundakovic, M. and F.A. Champagne, *Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A*. *Brain Behav Immun*, 2011. **25**(6): p. 1084-93.
29. Weaver, J.R., M. Susiarjo, and M.S. Bartolomei, *Imprinting and epigenetic changes in the early embryo*. *Mamm Genome*, 2009. **20**(9-10): p. 532-43.
30. Faulk, C. and D.C. Dolinoy, *Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals*. *Epigenetics*, 2011. **6**(7): p. 791-7.
31. Feil, R. and M.F. Fraga, *Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications*. *Nat Rev Genet*, 2011. **13**(2): p. 97-109.
32. El Hajj, N. and T. Haaf, *Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction*. *Fertil Steril*, 2013. **99**(3): p. 632-41.
33. Ludwig, M., et al., *Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples*. *J Med Genet*, 2005. **42**(4): p. 289-91.
34. Maher, E.R., et al., *Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART)*. *J Med Genet*, 2003. **40**(1): p. 62-4.
35. Farin, P.W., J.A. Piedrahita, and C.E. Farin, *Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos*. *Theriogenology*, 2006. **65**(1): p. 178-91.
36. Hiendleder, S., et al., *Tissue-specific effects of in vitro fertilization procedures on genomic cytosine methylation levels in overgrown and normal sized bovine fetuses*. *Biol Reprod*, 2006. **75**(1): p. 17-23.

37. Fauque, P., P. Jouannet, and H. Jammes, [*Parental imprinting related to Assisted Reproductive Technologies*]. *Gynecol Obstet Fertil*, 2008. **36**(11): p. 1139-46.
38. Zalko, D., et al., *Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A*. *Chemosphere*, 2011. **82**(3): p. 424-30.
39. Calafat, A.M., et al., *Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol:2003-2004*. *Environ Health Perspect*, 2004. **116**(1): p. 39-44.
40. Vandenberg, L.N., et al., *Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A*. *Environ Health Perspect*, 2012. **118**(8): p. 1055-70.
41. Volkel, W., N. Bittner, and W. Dekant, *Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Drug Metab Dispos*, 2005. **33**(11): p. 1748-57.
42. Volkel, W., et al., *Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration*. *Chem Res Toxicol*, 2002. **15**(10): p. 1281-7.
43. Balakrishnan, B., et al., *Transfer of bisphenol A across the human placenta*. *Am J Obstet Gynecol*, 2010. **202**(4): p. 393 e1-7.
44. Engel, S.M., et al., *Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid*. *Reprod Toxicol*, 2006. **21**(1): p. 110-2.
45. Tyl, R.W., et al., *Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats*. *Toxicol Sci*, 2002. **68**(1): p. 121-46.
46. Tyl, R.W., et al., *Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice*. *Toxicol Sci*, 2008. **104**(2): p. 362-84.
47. Kuiper, G.G., et al., *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*. *Endocrinology*, 1998. **139**(10): p. 4252-63.
48. Kurosawa, T., et al., *The activity of bisphenol A depends on both the estrogen receptor subtype and the cell type*. *Endocr J*, 2002. **49**(4): p. 465-71.
49. Watson, C.S., et al., *Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues*. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **274**(1-2): p. 1-7.
50. Watson, C.S., Y.J. Jeng, and M.Y. Kochukov, *Nongenomic signaling pathways of estrogen toxicity*. *Toxicol Sci*, 2010. **115**(1): p. 1-11.
51. Bouskine, A., et al., *Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor*. *Environ Health Perspect*, 2009. **117**(7): p. 1053-8.
52. Chevalier, N., A. Bouskine, and P. Fenichel, *Bisphenol A promotes testicular seminoma cell proliferation through GPER/GPR30*. *Int J Cancer*, 2012. **130**(1): p. 241-2.
53. Li, J., M. Ma, and Z. Wang, *In vitro profiling of endocrine disrupting effects of phenols*. *Toxicol In Vitro*, 2010. **24**(1): p. 201-7.
54. Wetherill, Y.B., et al., *The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells*. *Mol Cancer Ther*, 2002. **1**(7): p. 515-24.

55. Xu, L.C., et al., *Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro*. Toxicology, 2005. **216**(2-3): p. 197-203.
56. Abad, M.C., et al., *Structural determination of estrogen-related receptor gamma in the presence of phenol derivative compounds*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008. **108**(1-2): p. 44-54.
57. Okada, H., et al., *Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma*. Environ Health Perspect, 2008. **116**(1): p. 32-8.
58. Vanacker, J.M., et al., *Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta*. Embo J, 1999. **18**(15): p. 4270-9.
59. Li, D.K., et al., *Relationship between urine bisphenol-A level and declining male sexual function*. J Androl, 2010. **31**(5): p. 500-6.
60. Li, D.K., et al., *Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality*. Fertil Steril, 2011. **95**(2): p. 625-30 e1-4.
61. Meeker, J.D., et al., *Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic*. Reprod Toxicol, 2010. **30**(4): p. 532-9.
62. Kabuto, H., M. Amakawa, and T. Shishibori, *Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice*. Life Sci, 2004. **74**(24): p. 2931-40.
63. Okada, A. and O. Kai, *Effects of estradiol-17beta and bisphenol A administered chronically to mice throughout pregnancy and lactation on the male pups' reproductive system*. Asian J Androl, 2008. **10**(2): p. 271-6.
64. Chitra, K.C., C. Latchoumycandane, and P.P. Mathur, *Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats*. Toxicology, 2003. **185**(1-2): p. 119-27.
65. Signorile, P.G., et al., *Pre-natal exposure of mice to bisphenol A elicits an endometriosis-like phenotype in female offspring*. Gen Comp Endocrinol, 2010. **168**(3): p. 318-25.
66. Cobellis, L., et al., *Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women*. Biomed Chromatogr, 2009. **23**(11): p. 1186-90.
67. Itoh, H., et al., *Urinary bisphenol-A concentration in infertile Japanese women and its association with endometriosis: A cross-sectional study*. Environ Health Prev Med, 2007. **12**(6): p. 258-64.
68. Newbold, R.R., W.N. Jefferson, and E. Padilla-Banks, *Prenatal exposure to bisphenol a at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life*. Environ Health Perspect, 2009. **117**(6): p. 879-85.
69. Takeuchi, T., et al., *Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction*. Endocr J, 2004. **51**(2): p. 165-9.
70. Kandarakis, E., et al., *Endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome (PCOS): elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(3): p. E480-4.

71. Sugiura-Ogasawara, M., et al., *Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage*. Hum Reprod, 2005. **20**(8): p. 2325-9.
72. Cantonwine, D., et al., *Bisphenol a exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study*. Environ Health, 2010. **9**: p. 62.
73. Xiao, S., et al., *Preimplantation exposure to bisphenol A (BPA) affects embryo transport, preimplantation embryo development, and uterine receptivity in mice*. Reprod Toxicol, 2011. **32**(4): p. 434-41.
74. Berger, R.G., J. Shaw, and D. deCatanzaro, *Impact of acute bisphenol-A exposure upon intrauterine implantation of fertilized ova and urinary levels of progesterone and 17beta-estradiol*. Reprod Toxicol, 2008. **26**(2): p. 94-9.
75. Mok-Lin, E., et al., *Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF*. Int J Androl, 2010. **33**(2): p. 385-93.
76. Fujimoto, V.Y., et al., *Serum unconjugated bisphenol A concentrations in women may adversely influence oocyte quality during in vitro fertilization*. Fertil Steril, 2011. **95**(5): p. 1816-9.
77. Hiroi, H., et al., *Stage-specific expression of estrogen receptor subtypes and estrogen responsive finger protein in preimplantational mouse embryos*. Endocr J, 1999. **46**(1): p. 153-8.
78. Takai, Y., et al., *Estrogen receptor-mediated effects of a xenoestrogen, bisphenol A, on preimplantation mouse embryos*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **270**(3): p. 918-21.
79. Lee, M.S., et al., *Human endometrial cell coculture reduces the endocrine disruptor toxicity on mouse embryo development*. J Occup Med Toxicol. **7**(1): p. 7.
80. Pfeiffer, E., et al., *Interference with microtubules and induction of micronuclei in vitro by various bisphenols*. Mutat Res, 1997. **390**(1-2): p. 21-31.
81. Takai, Y., et al., *Preimplantation exposure to bisphenol A advances postnatal development*. Reprod Toxicol, 2001. **15**(1): p. 71-4.
82. Dolinoy, D.C., D. Huang, and R.L. Jirtle, *Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(32): p. 13056-61.
83. Susiarjo, M., et al., *Bisphenol a exposure disrupts genomic imprinting in the mouse*. PLoS Genet, 2013. **9**(4): p. e1003401.
84. Kang, E.R., et al., *Effects of endocrine disruptors on imprinted gene expression in the mouse embryo*. Epigenetics, 2011. **6**(7): p. 937-50.
85. Bromer, J.G., et al., *Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response*. Faseb J, 2010. **24**(7): p. 2273-80.
86. Wong, R.L. and C.L. Walker, *Molecular pathways: environmental estrogens activate nongenomic signaling to developmentally reprogram the epigenome*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(14): p. 3732-7.
87. Takatori, S., et al., *Di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate in media for in vitro fertilization*. Chemosphere, 2012. **86**(5): p. 454-9.

88. Mahalingaiah, S., et al., *Bisphenol A is not detectable in media or selected contact materials used in IVF*. *Reprod Biomed Online*, 2012. **25**(6): p. 608-11.
89. Lacroix, M.Z., et al., *Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations*. *Talanta*, 2011. **85**(4): p. 2053-9.
90. Xie, X., et al., *Investigation of the interaction between endocrine disruptor bisphenol A and human serum albumin*. *Chemosphere*. **80**(9): p. 1075-80.
91. Yang, C.Z., et al., *Most plastic products release estrogenic chemicals: a potential health problem that can be solved*. *Environ Health Perspect*. **119**(7): p. 989-96.

Nom : RABINEL **Prénom :** Camille

Titre en français: Détection du bisphénol A dans les milieux de culture embryonnaire utilisés en routine chez l'Homme.

Titre en Anglais: Bisphenol A detection in Human embryo culture media.

Date et Lieu : Toulouse, le 25 Octobre 2013.

Résumé en français :

Parmi les perturbateurs endocriniens, le bisphénol A (BPA) constitue l'un des polluants chimiques les plus répandus. L'exposition à des doses faibles de BPA (1nM) lors de la culture embryonnaire chez la souris perturberait le développement embryonnaire et se répercuterait sur la croissance post natale (Takai et al. 2001).

Nous avons voulu détecter la présence de BPA dans 4 types de milieux de culture : Global® - LifeGlobal ®), Continuous Single Culture® (IrvineScientific), ISM1™(Origio®) et BlastAssist® (Origio®), dans les conditions de stockage, dans les conditions de culture et dans 3 sources de protéines différentes. Le dosage de BPA a été réalisé par HPLC couplée à une spectrométrie de masse. Nous avons retrouvé du BPA de manière significative dans les milieux Continuous Single Culture®, ISM1™ et BlastAssist®, à des concentrations de 5,17nM (+/- 3,91), 3,19nM(+/-1,40) et 3,89nM(+/-2,40) respectivement. Cette étude est la première à montrer une contamination des milieux de culture embryonnaire par le BPA.

Résumé en anglais:

Bisphenol A (BPA) is one of the most prevalent endocrine disruptor. Embryos exposition to a weak BPA dose (1nM) may disrupt their development and impact on post natal growing (Takai et al. 2001). Our study aimed to detect BPA in 4 embryo culture media Global® (LifeGlobal®), Continuous Single Culture® (IrvineScientific), ISM1™(Origio®) and BlastAssist® (Origio®). We have analysed commercial storage conditions, IVF culture conditions and 3 types of protein source. BPA concentration was determined by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. We found BPA rates of 5,17nM (+/- 3,91), 3,19nM(+/-1,40) and 3,89nM(+/-2,40) in Continuous Single Culture®, ISM1™ and BlastAssist® respectively. We show for the first time BPA contamination of human embryo culture media.

Discipline administrative: Biologie Médicale.

Mots-clés: bisphénol A, perturbateur endocrinien, culture embryonnaire, FIV, épigénétique, milieu de culture, croissance embryonnaire.

Université Toulouse III – 118 route de Narbonne – 31062 TOULOUSE Cedex 04 – France.

Directeur de Thèse : Docteur Roger LEANDRI.