

Validation de la mesure d'un paramètre critique en culture d'embryons humains : le pH

Method validation of a critical parameter in human embryos culture: culture media pH

Lucie
Chansel-Debordeaux¹
Vincent Dagorne¹
Monique Mercier¹
Volcy Soula¹
Emmanuelle Chauzit²
Sandrine Dabernat³
Evelyne Peuchant³
Clément Jimenez¹
Aline Papaxanthos-Roche¹

¹ Service de biologie de la reproduction-Cecos, CHU Bordeaux, France
<lucie.chansel-debordeaux@chu-bordeaux.fr>

² Service qualité accréditation, CHU Bordeaux, France

³ Service de biochimie, CHU Bordeaux, France

Résumé. La culture *in vitro* d'embryons humains dépend largement des conditions atmosphériques dans lesquelles ces embryons se développent au sein des incubateurs du laboratoire d'assistance médicale à la procréation. Le pH des milieux de culture, reflet indirect de la teneur en CO₂ à l'intérieur de ces enceintes, est un paramètre critique de la culture embryonnaire. Une collaboration entre les services de biochimie et de la biologie de la reproduction a permis d'entreprendre une mesure automatisée du pH du milieu de culture sur analyseur à gaz du sang. Cette méthode a fait l'objet d'une validation et d'une évaluation de ses performances. Elle est applicable dans tous les laboratoires quels que soient le milieu et les conditions de culture. Elle permet une surveillance stricte de ce paramètre pour l'optimisation des conditions de culture indispensable à l'amélioration des résultats des tentatives de fécondation *in vitro*.

Mots clés : norme ISO 15189, accréditation, pH, embryologie, métrologie, FIV

Abstract. *In vitro* human embryos culture depends largely on the atmospheric conditions within the incubators of the laboratory. The pH of culture media, an indirect reflection of the CO₂ content inside these incubators, is a critical parameter. Collaboration between the biochemistry and reproductive biology departments enabled the automated measurement of the pH in the culture medium on a blood gas analyzer. This method has been validated and evaluated. It is applicable in all laboratories whatever the medium and the conditions of culture. It allows strict monitoring of this parameter for the optimization of the culture conditions necessary to improve the results of *in vitro* fertilization attempts.

Key words: ISO 15189 standard, accreditation, pH, embryology, metrology, IVF

La culture embryonnaire est une des étapes critiques du processus de fécondation *in vitro* (FIV). Le succès d'une tentative dépend largement des conditions environnementales dans lesquelles l'embryon se développe. À l'intérieur de l'incubateur, il doit retrouver les conditions physiologiques préimplantatoires du tractus génital féminin. Le contrôle optimal de la concentration en gaz et de la température à l'intérieur de chaque incubateur est donc primordial pour limiter au maximum le stress des gamètes et des embryons aux conditions extérieures. Selon le paragraphe I.4.1 de l'arrêté du 30 juin 2017 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation, les conditions de culture optimales imposent la maîtrise et la surveillance de plu-

sieurs paramètres, notamment du pH. « La composition de l'atmosphère à l'intérieur des incubateurs, par contrôle de la teneur en gaz ou du pH des milieux incubés, est maîtrisée. Une procédure de surveillance du pH et/ou du/des gaz utilisé(s) est mise en place définissant les paramètres de criticité et de surveillance » [1]. De plus, le maintien d'un pH approprié du milieu de culture utilisé est essentiel dans un incubateur à CO₂ selon la norme ISO 15189 [2]. Le paragraphe 5.3.1.4 « Étalonnage des équipements et traçabilité métrologique » précise que « Le laboratoire doit disposer d'une procédure documentée pour l'étalonnage de l'équipement susceptible d'affecter directement ou indirectement les résultats d'examen ». Le SH INF 50 révision 04 présente les

portées types d'accréditation. La mesure du pH se situe dans le domaine biologie médicale, famille hématologie-immunologie-biologie de la reproduction, sous-domaine biologie de la reproduction, sous-famille activité biologique d'assistance médicale à la procréation (AMP) [3]. Le SH REF 02, révision 05, paragraphe 5.3.1.4 rappelle l'importance d'identifier les équipements critiques. « Le laboratoire identifie ainsi les grandeurs mesurées correspondantes ainsi que les exigences métrologiques spécifiées » [4]. Le SH GTA 05, paragraphe 5.3.1.4, spécifie l'obligation de la mesure du pH pour le contrôle des milieux de culture au sein des enceintes en AMP considérés critiques [5]. Selon les recommandations du fournisseur, le pH doit être maintenu autour de 7,2-7,4 grâce à une atmosphère gazeuse enrichie en CO₂ pendant toute la durée de la culture.

Au sein d'un service d'AMP, la métrologie et la traçabilité mises en œuvre ne sont pas significativement différentes de celles d'autres domaines analytiques. Les étuves de culture en AMP étant considérées comme « critiques », le service doit mettre en place une méthodologie adaptée pour garantir le maintien d'un pH optimal défini par le fournisseur. La fréquence de contrôle du pH dans le milieu de culture est déterminée par le biologiste responsable. Une des méthodes utilisées jusqu'à maintenant dans notre service était de mesurer indirectement le pH par le relevé de la teneur en CO₂ à l'aide de capteurs placés à l'intérieur des incubateurs. Une solution directe serait de réaliser le contrôle du pH du milieu de culture grâce à un analyseur à gaz du sang [6], mais cette méthode n'a encore jamais été validée dans un tel milieu.

L'objectif principal est donc de valider la mesure du pH du milieu de culture embryonnaire par un analyseur à gaz du sang dans trois types d'incubateurs différents : les incubateurs conventionnels (type HeracellTM ou BinderTM), un incubateur multi-chambres de type K-Systems G-185TM et un système de culture intégré time-lapse (type EmbryoscopeTM). Le second objectif est d'étudier la relation qu'il existe entre le pH de ce milieu et les concentrations en CO₂ délivrées par l'incubateur afin de connaître les teneurs adéquates en gaz pour l'obtention d'un pH optimal. La méthodologie utilisée est donc détaillée pour que les centres FIV bénéficiant de la proximité d'un laboratoire de biochimie puissent l'appliquer selon leurs propres conditions de culture embryonnaire.

Matériels et méthodes

Système de mesure actuel de la teneur en CO₂ dans les incubateurs du laboratoire d'AMP

Plusieurs types d'étuve sont utilisés pour la culture embryonnaire. L'incubateur à CO₂, N₂ et O₂ conventionnel (HeracellTM, BinderTM) est une étuve tri-

compartimentée. L'incubateur multichambre (K-Systems G185TM) tri gaz (CO₂, N₂ et O₂) permet une culture dans 10 compartiments indépendants. Cet incubateur est suivi sur le plan métrologique par l'organisme fournisseur Origio[®]. Celui-ci est chargé d'étalonner annuellement l'incubateur en CO₂, O₂ et température. Afin de satisfaire à l'exigence d'un enregistrement en continu, ces deux systèmes sont équipés de capteurs de CO₂ reliés à un logiciel dédié à la métrologie (Sirius[®]). Ces sondes externes à CO₂ sont soumises à vérification annuelle par l'organisme qui fournit ces sondes (société JRI[®]). L'incubateur time lapse (EmbryoscopeTM) est composé d'une chambre de culture associée à un système intégré de prise de vues. Il possède un système d'enregistrement interne des constantes physiques et un système de report d'alarme sur Sirius[®]. La maintenance et l'étalonnage des paramètres critiques sont réalisés tous les 6 mois par le fournisseur (Fertilitech[®]).

Systèmes de mesures du pH dans le milieu de culture embryonnaire sur analyseur à gaz du sang

Nous avons choisi d'évaluer la mesure du pH du milieu de culture grâce à un analyseur à gaz du sang. En effet, les sondes externes à CO₂ précédemment décrites présentent une dérive au cours du temps et manquent de robustesse en milieu humide. Par ailleurs, il nous a semblé important de s'assurer des bonnes conditions environnementales de culture et de ne pas se limiter à l'étalonnage semestriel ou annuel proposé par le fournisseur.

Une collaboration des services de biochimie et de biologie de la reproduction (BDR) du centre hospitalier universitaire de Bordeaux a permis d'entreprendre des mesures de pH du milieu de culture sur l'appareil à gaz du sang délocalisé de la maternité, RP 1260 Siemens, situé à proximité du laboratoire d'AMP. La maintenance de l'analyseur à gaz du sang (suivi et validation des programmes de contrôles de qualité internes/évaluations externes de la qualité, étalonnages, entretien de l'appareil) est assurée par le service de biochimie.

L'étape préalable à l'utilisation en routine a consisté à valider la mesure du pH grâce à l'analyseur à gaz du sang sur une matrice différente (milieu de culture unique Global[®]-HSA (Lifeglobal[®]) utilisé pour la culture des gamètes et des embryons) de celle pour laquelle il est configuré (sang). L'objectif était de vérifier la capacité de l'automate à rendre une mesure juste et fiable du pH sur ce milieu. De plus, il faut s'assurer que celui-ci ne présente ni de danger pour l'automate ni de risque de contaminations inter-échantillons. Pour cela, nous avons réalisé une validation de méthode quantitative en portée B ou adaptée selon le formulaire Cofrac : le SH FORM 43 [7]. D'après le SH GTA 04 [8], « le laboratoire établit les critères de performance de sa méthode. Il les compare aux données de référence dont il dispose (fournisseur, bibliographie,

sociétés savantes. . .) et conclut quant à l'acceptabilité de sa méthode en fonction de ses besoins vis-à-vis du critère testé. »

Analyse de risque

Une analyse des risques a été réalisée à l'aide de la règle des 5M selon un ordre chronologique pour répertorier tous les éléments susceptibles d'influencer les résultats. Elle a été associée à la méthode AMDEC pour déterminer le niveau de criticité de ces éléments ainsi que les modalités de maîtrise mises en place au laboratoire pour diminuer cette criticité. Les risques dont l'indice de criticité est égal ou supérieur à 12 sont dits critiques.

Critères de performance et tolérances

La répétabilité a été déterminée par l'analyse successive de 10 échantillons de milieu Global®-HSA par le même opérateur le même jour avec la même technique et dans les mêmes conditions. La consigne en CO₂ est de 6 %. Le nombre de passages limité à 10 se justifie compte tenu du coût du consommable.

La fidélité intermédiaire a été calculée à partir de 10 échantillons du milieu étudié sur 3 jours de suite par le même opérateur avec une consigne en CO₂ de 6 %. Un seul niveau a été testé. Le nombre de passages a été limité compte tenu du coût du consommable.

La mesure du pH sur l'analyseur à gaz du sang a été comparée avec celle d'un pH-mètre standard (sonde à électrode en verre, Mettler Delta 320 N°M2601) considéré comme méthode de référence. Ce pH-mètre de référence possède des étalons internationaux accrédités Cofrac. La comparaison des deux méthodes a été effectuée sur une plage de consignes en CO₂ comprise entre 3 et 7 % (couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré). Les méthodes de comparaison utilisées ont été : droites de régression, graphiques des différences et des quotients, diagramme de Bland-Altman (comparaison des moyennes des mesures à leurs différences) [8].

La contamination inter-échantillon a été déterminée par l'analyse à 3 reprises consécutives d'un échantillon à valeur élevée (H1, H2, H3, de moyenne mH) après rinçage de l'appareil, suivie d'un échantillon à valeur basse également analysé 3 fois (B1, B2, B3). Les séquences (H1, H2, H3, B1, B2, B3) ont été répétées 3 fois afin d'établir la moyenne des B1 (mB1) et la moyenne des B3 (mB3). Le pourcentage de contamination entre les échantillons est calculé selon la formule suivante : contamination en % = $(mB1 - mB3) \times 100 / (mH - mB3)$. Deux niveaux d'échantillons ont été choisis préalablement : 1 niveau Haut = valeur du pH pour un taux de CO₂ à 4 % et 1 niveau Bas = valeur du pH pour un taux de CO₂ à 6 %. Le niveau de la contamination doit être proche de zéro.

Une évaluation de la stabilité du milieu testé a également été réalisée. Selon les données du fournisseur, la

conservation du milieu est de 7 jours à +4 °C et 72 heures sous 5 à 6 % de CO₂ à 37 °C [9]. Le test a consisté en la répétition de 10 mesures de pH à raison d'une mesure par jour sur un intervalle de 13 jours. Les limites de stabilité théoriques (Lst) adaptées au milieu étudié ont été établies arbitrairement à +/- 0,02 de la valeur cible v (pH à 7,253). Les limites supérieure et inférieure calculées sont donc : 7,233-7,273. Chaque mesure du pH du milieu doit être comprise dans l'intervalle [v - Lst ; v + Lst]. La limite de durée de stabilité correspond à la dernière valeur de pH du milieu comprise dans l'intervalle [v - Lst ; v + Lst].

Le laboratoire doit ensuite définir ses exigences métrologiques spécifiées : tolérances ou erreurs maximales tolérées (EMT), niveau d'incertitude et plages d'utilisation. Il appartient au laboratoire de définir ses propres EMT sur la concentration en CO₂ délivrée dans ses incubateurs. Le milieu de culture global utilisé est tamponné par des ions HCO₃⁻ et équilibré par un apport constant en CO₂. La maîtrise d'une atmosphère contrôlée en CO₂ dans un incubateur est nécessaire à la bonne maîtrise du pH de ce milieu. Le choix des EMT permet de fixer les limites du taux de CO₂ de sorte que le pH de chaque milieu de culture soit toujours compris entre 7,2 et 7,4. Pour répondre à cet objectif, une étude du comportement du milieu en fonction de la concentration en CO₂ a été réalisée dans les différents types d'enceintes du laboratoire d'AMP. Dans le but de reproduire fidèlement les conditions de culture au laboratoire, le milieu testé a été préalablement incubé pendant au moins 12 heures pour chaque valeur de CO₂. La mesure du pH a été effectuée pour des consignes allant de 3,5 % à 7 % en augmentant chaque jour le taux de CO₂ de 0,5 %.

Application de la mesure du pH en routine sur analyseur à gaz du sang au sein du laboratoire d'AMP

Ce procédé de mesure nouvellement validé est rendu possible grâce à l'élaboration d'un contrat liant les services de biochimie et de la BDR. Le personnel est soumis à une évaluation par le biologiste responsable pour la mesure du pH du milieu de culture réalisé selon un mode opératoire et une habilitation est ensuite délivrée. En terme pratique, la vérification du pH du milieu est effectuée en routine pour tous les incubateurs du laboratoire à chaque changement de lot et selon une fréquence mensuelle. Des contrôles rapprochés doivent être effectués lors de la mise en place de la méthode et pendant une période à définir par le biologiste. Le milieu de culture est préalablement aliquoté puis placé dans une enceinte de référence sous 5 à 6 % de CO₂ pendant 12 heures. En cas de valeur de pH inférieure à 7,2 ou supérieure à 7,4, confirmée sur deux autres mesures à 24 et 48 heures, la consigne en CO₂ de l'incubateur est modifiée afin d'être adaptée au pH adéquat. Chaque changement de consigne est suivi d'un contrôle du pH le lendemain matin.

Tableau 1. Synthèse des points critiques de l'analyse de risques de la mesure du pH du milieu de culture sur analyseur à gaz du sang.

Élément défaillant	Type de risque	Mode de défaillance	Causes	Effets	G	F	D	IC	Modalités de maîtrise existantes
J-1 : mise à l'étuve du milieu de culture pour équilibrage en température et CO ₂									
CO ₂	Matériel	Défaut ou excès de CO ₂ dans les incubateurs	Manque d'entretien des incubateurs, métrologie défaillante	Perturbation du pH du milieu de culture, Mesure erronée du pH	3	3	2	18	Les paramètres des incubateurs, température et pourcentage de CO ₂ , sont suivis par un système continu « JRI » relié au biomédical et à la sécurité
CO ₂	Méthode	Milieu insuffisamment équilibré	Négligence/inattention = Main-d'œuvre non ou mal formée/habilité => Méthode non appliquée	Perturbation du pH du milieu de culture, mesure erronée du pH	3	3	2	18	MO LAB 047-Mesure du pH du milieu de culture sur Analyseur Rapidlab 1260
CO ₂	Méthode	Bouchon de l'aliquot de milieu complètement fermé	=> Méthode non appliquée	Défaut d'équilibrage, Mesure erronée du pH	3	3	2	18	MO LAB 047-Mesure du pH du milieu de culture sur Analyseur Rapidlab 1260
J0 : transport et mesure du pH du milieu de culture sur appareil à gaz du sang de la maternité									
Appareil à gaz du sang Rapidlab 1260	Matériel	Appareil défectueux ou en panne, CQI et/ou calibration défectueux	Mauvais entretien de l'appareil	Mesure erronée du pH	4	1	4	16	Maintenance régulière de l'appareil par le service de biochimie Surveillance efficace des résultats des autocontrôles et calibration par la biochimie
Organisation générale									
Formation initiale du personnel	Main-d'œuvre	Méthodes et techniques non adaptées	Assimilation incorrecte de la formation	Mesure du pH erronée, mauvais relevé	4	2	2	16	MO LAB 047-Mesure du pH du milieu de culture sur Analyseur Rapidlab 1260 Procédure de formation générale PR-LAB-004
Habilitation du personnel	Main-d'œuvre	Défaut d'habilitation	Assimilation incorrecte de la formation	Mesure du pH erronée, mauvais relevé	4	2	2	16	MO LAB 047-Mesure du pH du milieu de culture sur Analyseur Rapidlab 1260 Fiche d'habilitation technique AMP EN-GRH-104

Tableau I. (Suite).

Élément défaillant	Type de risque	Mode de défaillance	Causes	Effets	G	F	D	IC	Modalités de maîtrise existantes
Maintien des compétences du personnel	Main-d'œuvre	Manque de maintien des compétences	Manque de rigueur du personnel, manque de motivation ou d'investissement	Dérive des pratiques du personnel habilité	4	2	2	16	Réaliser un maintien des compétences tous les 2 ans et lorsqu'un biologiste le juge nécessaire selon EN LAB 014
Planning/Organisation/Traçabilité	Main-d'œuvre	Défaut de prises des mesures, mauvaise communication, manque de traçabilité, fiche d'enregistrement non à jour	Manque de rigueur du personnel, manque de motivation ou d'investissement	Dérive des pratiques du personnel habilité	4	2	2	16	EN PRELUE 001-Contrôle du pH du milieu Global dans l'incubateur MO LAB 047-Mesure du pH du milieu de culture sur Analyseur Rapidlab 1260

Résultats

Analyse de risque

Après analyse des risques, il paraît évident que les points les plus critiques sont liés à la formation du personnel (main d'œuvre) ainsi qu'à la maîtrise du conditionnement en CO₂ pour le milieu étudié (tableau 1).

Critères de performance de la méthode de mesure du pH du milieu de culture embryonnaire sur analyseur à gaz du sang

Répétabilité

La valeur de pH attendue se situe entre 7,2 et 7,4. La moyenne est de 7,229 avec un écart type de 0,022. Le CV calculé est de 0,3 % soit inférieur au CV acceptable défini par la SFBC (1,5 %) [10]. La répétabilité est donc conforme.

Fidélité intermédiaire

La valeur cible de pH se situe entre 7,2 et 7,4. La moyenne est de 7,221 avec un écart type de 0,033. Les résultats montrent un CV conforme (0,45 %) car inférieur à la limite d'acceptabilité selon la SFBC (2 %) [10].

Approche de la justesse/exactitude/estimation de l'incertitude de mesure/intervalle de mesures/recherche d'interférences

Ces paramètres sont non applicables dans notre laboratoire.

Comparaison de méthodes

L'équation de la droite de régression obtenue par comparaison de la mesure du pH par utilisation de l'appareil à gaz du sang ou par utilisation d'un pH-mètre est la suivante : $y = 1,0371x - 0,2753$. La pente mesurée (1,0371) est proche de 1 et l'interception (-0,2753) est proche de 0 (figure 1 et tableau 2). Les résultats des différents diagrammes montrent un nombre de déviants égal à zéro. La différence limite acceptable calculée (Vassault) est de 6,93 %. Les deux méthodes sont donc comparables.

Contamination inter-échantillons

La valeur retrouvée (-1,37509544) étant proche de la valeur nulle, aucune contamination n'a été mise en évidence (tableau 3).

Stabilité des réactifs et consommables

Les résultats des 10 passages d'échantillons réalisés sur un intervalle de 13 jours montrent que toutes les valeurs étaient comprises dans l'intervalle toléré (figure 2). Il existe donc une stabilité du réactif sur toute la période testée.

Déclaration d'aptitude

La méthode a été déclarée conforme car validée par les résultats des tests réalisés sur site.

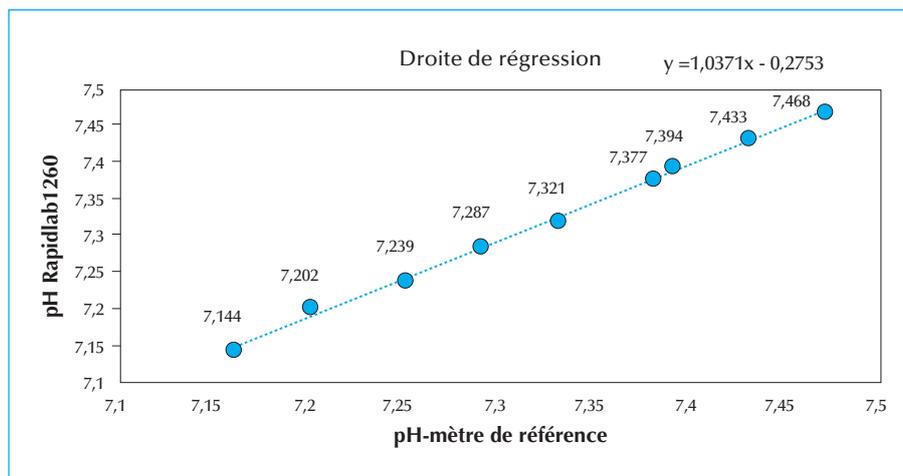


Figure 1. Comparaison de méthodes de la mesure du pH sur le milieu Global[®]-HSA par droite de régression.

Tableau 2. Comparaison de méthodes de la mesure du pH sur le milieu Global[®]-HSA : résultats obtenus à partir de l'équation de la droite de régression.

Niveaux	Méthode x	Y calculé	Incertitude tolérable	Incertitude observée	Conclusion
Bas	7,2	7,191	0,498	0,009	Corrélé
Moyen	7,4	7,399	0,512	0,001	Corrélé
Haut	7,55	7,554	0,523	-0,004	Corrélé

Tableau 3. Etude de la recherche de contamination inter-échantillons pour le milieu Global[®]-HSA.

Valeurs niveau haut	H1	H2	H3
Passage 1	7,395	7,387	7,390
Passage 2	7,402	7,392	7,389
Passage 3	7,393	7,388	7,399
Moyenne mH = 7,39277778	7,397	7,389	7,393
Valeurs niveau bas	B1	B2	B3
Passage 1	7,238	7,242	7,245
Passage 2	7,244	7,238	7,240
Passage 3	7,241	7,245	7,244
Moyenne mB	7,241	7,242	7,243

Contamination % : $-0,2/0,14544445 = -1,37509544$.

Résultat des études de corrélation du pH en fonction du taux de CO₂ pour le milieu étudié

Plusieurs courbes de corrélation pH-CO₂ ont été obtenues avec chaque type d'incubateur permettant de définir une valeur cible de CO₂ ainsi que l'écart toléré autour de cette valeur (figure 3). Pour les incubateurs conventionnels (Heracell[™] et Binder[™]), le taux de CO₂ doit se situer entre 4,5 et 6,5 % afin d'obtenir un pH optimal entre 7,2 et

7,4. À partir de cette corrélation, il est possible de définir une valeur cible en CO₂ située à 5,5 % avec un écart toléré de ± 1 % (EMT 1 %). Dans le cadre des incubateurs multi-chambres K-Systems G185[™], il a été décidé de tester un compartiment différent sur 6 jours, en partant du principe que la concentration en CO₂ est répartie de manière homogène au sein de chaque chambre d'incubation. Les résultats permettent de constater que pour obtenir un pH

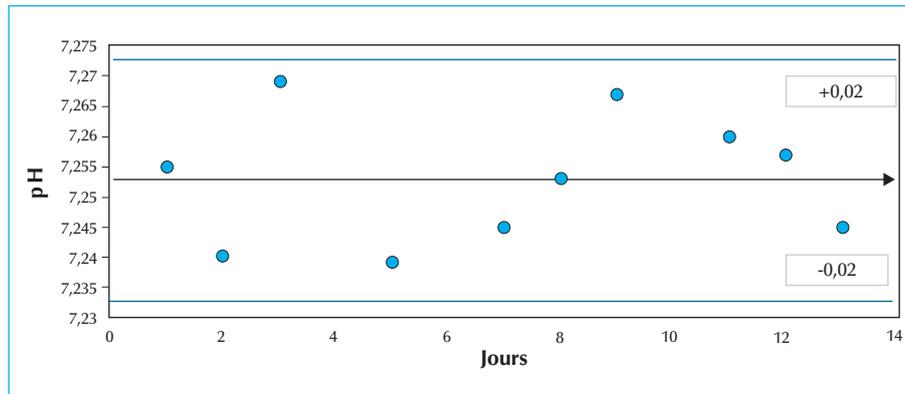


Figure 2. Stabilité du milieu Global®-HSA testée sur 13 jours. Chaque valeur doit être comprise dans l'intervalle d'acceptation 7,233-7,273.

optimal entre 7,2 et 7,4, la consigne de CO₂ doit se trouver entre 4 et 8 %. Nous avons défini pour cet incubateur une consigne cible en CO₂ à 6 % avec une EMT de ± 1 %. Pour le time lapse monochambre Embryoscope™, le taux de CO₂ doit se situer entre 6 et 8 % : la consigne cible est donc de $7 \% \pm 1$ %. La consigne des taux de CO₂ est différente en fonction des différents systèmes d'incubation. Il apparaît donc indispensable que cette étude de corrélation du pH au taux de CO₂ soit effectuée au sein de chaque laboratoire et ce, pour chaque type d'étuve.

Discussion

Le principal système tampon acido-basique dans un organisme mammifère est représenté par le couple acide carbonique/bicarbonate. Pour réguler le pH extracellulaire (pHe), les milieux de culture embryonnaire utilisent un système tampon à base de bicarbonates (25-30 mM) et d'une atmosphère enrichie en CO₂. Le pH intracellulaire (pHi) des embryons de mammifères est aux alentours de 7,2-7,3 [11]. En outre, le pHe ne reflète pas exactement le pHi de l'ovocyte ou de l'embryon. L'embryon est capable de tamponner d'éventuelles variations de pHe et possède des mécanismes intracellulaires l'aidant à réguler son pHi [12, 13]. Pour autant, les fabricants de milieux de culture se sont adaptés pour commercialiser des milieux à utilisation de pH entre 7,2 et 7,4. Certains préconisent le changement de consigne du pHe en fonction du gamète ou du stade embryonnaire. Cependant, le changement de pHe pendant la culture embryonnaire n'a pas démontré expérimentalement une amélioration des résultats [14]. Les milieux contenant différentes concentrations de nutriments comme le lactate ou les acides aminés, peuvent entraîner un pHi différent tout en ayant le même pHe. Dale *et al.* [15] ont évalué la sensibilité de la fécondation et du développement embryonnaire précoce chez l'homme au pHe. Leurs résultats ont montré que la FIV

conventionnelle par insémination de spermatozoïdes sur des ovocytes matures est sensible au pHe par rapport à la technique ICSI. Cela peut être expliqué par la sensibilité pH-dépendante de l'interaction entre le spermatozoïde et la zone pellucide.

La maîtrise du pHe est donc essentielle dans les différentes étapes de la FIV. Le raccordement métrologique des appareils de mesure permet d'attester que la valeur mesurée est juste et fiable. Les systèmes de mesure du pH dans les incubateurs de culture embryonnaire, tels que les systèmes portatifs, sont nombreux. L'utilisateur en assure la maintenance et la vérification Cofrac. Une alternative est de faire appel à un système de biologie délocalisée. Mais selon le SH-GTA 01 [16], les automates ou analyseurs fermés, tels que l'analyseur à gaz du sang, sont considérés comme des systèmes analytiques sur lesquels il n'est pas possible de procéder aux raccordements métrologiques des grandeurs impliquées. À minima, le laboratoire utilise des contrôles de qualité, internes et externes, lui permettant de s'assurer de la maîtrise de son processus analytique, avec un suivi rigoureux et documenté de ces éléments. Les résultats des contrôles qualités internes réalisés automatiquement par l'automate quatre fois par jour sont suivis au CHU de Bordeaux par le service de biochimie auquel il est rattaché. Les étalonnages en 1 point (toutes les heures) ou en 2 points (3 fois par jour) sont également déclenchés automatiquement par l'automate.

Il est indispensable de suivre les critères de performance de la méthode nouvellement mise en place. En ce qui concerne la répétabilité et la fidélité intermédiaire, nous avons fait le choix d'utiliser les référentiels d'acceptation de la SFBC. Ces bornes ont été construites sur l'état de l'art analytique mais il existe probablement un facteur de variabilité induit par la matrice concernée. Par ailleurs, parmi l'ensemble de l'évaluation du pH, la procédure de définition de l'erreur maximale tolérée pour le CO₂ est primordiale puisqu'elle permet de définir une valeur cible en CO₂ (%) pour chaque incubateur ainsi que l'intervalle maximal requis autour de cette valeur. La

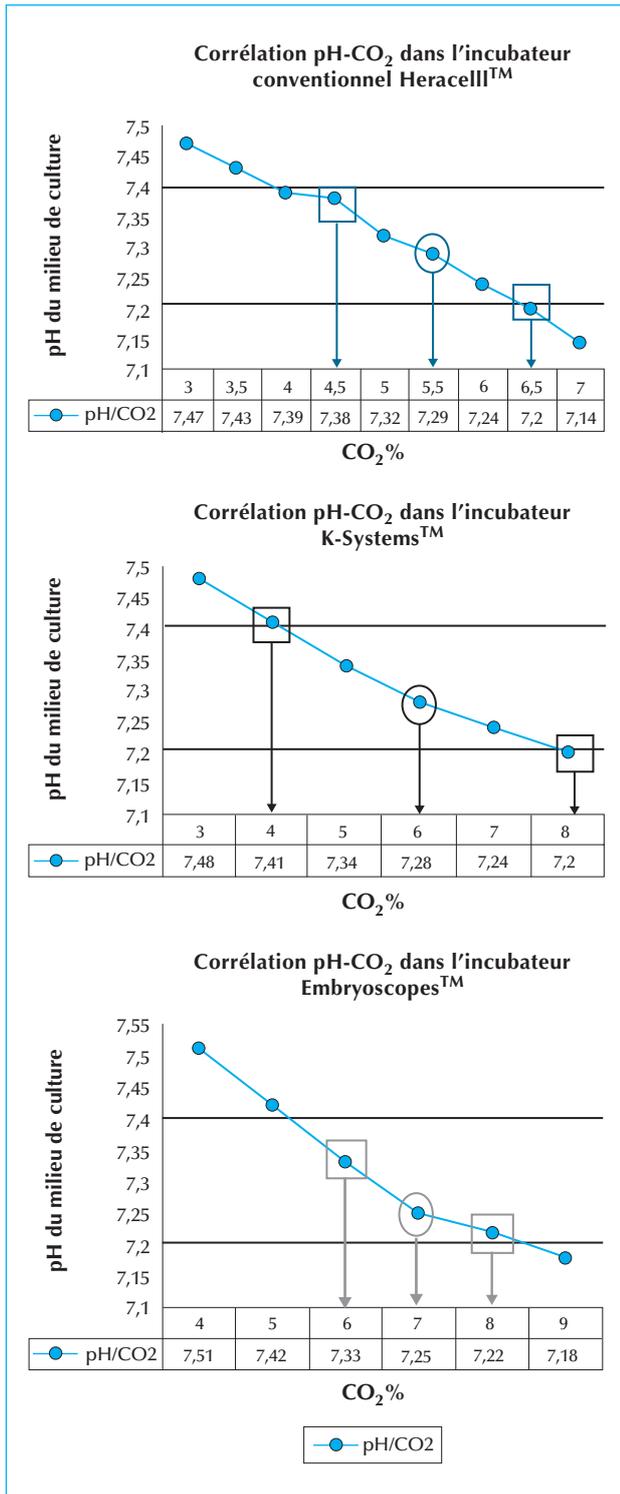


Figure 3. Courbes de corrélation pH-CO₂ avec le milieu de culture Global®-HSA pour les incubateurs conventionnel, multi-chambres K-Systems™ et time-lapse Embryoscope™.

définition d'EMT répond au besoin du laboratoire d'optimiser ses conditions de culture embryonnaire pour améliorer ses indicateurs qualités et notamment celui du taux de grossesses par ponction. La définition de cette EMT répond également à l'obligation normative en métrologie : « Le LBM identifie ses équipements critiques, c'est-à-dire ayant une incidence significative sur l'exactitude et la fiabilité des résultats, employés dans le cadre des processus pré-, per- et post-analytiques. » [4]. L'EMT a été définie pour que le personnel du laboratoire soit prévenu en cas de valeur de CO₂ se situant en dehors de l'intervalle de tolérance.

Le contrôle du pH du milieu de culture grâce à un analyseur à gaz du sang permet de vérifier que la culture embryonnaire se fait dans des conditions environnementales adéquates. Les sondes à CO₂ restent pour autant utiles en termes de gestion des risques. En effet, dans la mesure où le contrôle direct du pH ne se fait pas en temps réel, les sondes à CO₂ permettent de contrôler en continu un problème d'arrivée de gaz dans l'étuve (notamment bouteille vide, problème technique d'arrivée de CO₂, panne de l'électrovanne entraînant un taux de CO₂ trop élevé dans l'étuve). Le raccordement de ces sondes au logiciel dédié à la métrologie permet d'alerter le personnel en cas de défaillance.

La mise au point d'un système de contrôle tel que nous l'avons développé nécessite une main-d'œuvre plus conséquente. Ces contrôles amènent leur lot de contraintes notamment en termes de temps dédié à cette activité. Cependant, ce système devrait apporter un retentissement positif sur la qualité de la culture embryonnaire améliorant ainsi la prise en charge des couples. Ces résultats ne pourront néanmoins être réellement appréciés qu'à moyen terme grâce au suivi des résultats des tentatives (taux de grossesses par ponction et par transfert) mais aussi par des critères de performances intermédiaires tels que le taux de fécondation obtenu en FIV, la fragmentation embryonnaire ou le taux de blastulation.

Conclusion

La mise en place de ce nouveau système de contrôle du pH pour tous les incubateurs de notre service d'AMP répond tout d'abord à plusieurs exigences réglementaires et garantit par la même occasion la qualité des résultats des tentatives. Ces mesures de la valeur de pH en fonction du taux de CO₂ sont fonction du type de milieu et de système de culture utilisé. Il sera donc nécessaire que chaque laboratoire d'AMP réalise ce travail pour chaque milieu utilisé et définisse les bornes de la consigne en CO₂ pour chaque étuve.

Il permettra sans nul doute d'optimiser les conditions de culture embryonnaire. L'adaptation de la mesure du pH par le réglage des teneurs en CO₂ au sein de ces enceintes permettra de corriger tout écart de CO₂ susceptible d'engendrer des effets néfastes sur l'embryon. L'écart maximal toléré autour d'une valeur cible en CO₂ pourra également être resserré à l'avenir afin de réduire les variations du pH. L'augmentation de la fréquence des contrôles du pH (bi-mensuel, hebdomadaire voire quotidien) contribuera à rendre les conditions de culture toujours plus fiables.

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Arrêté du 30 juin 2017 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 modifié relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation.
2. AFNOR. NF EN ISO 15189 : laboratoires d'analyses de biologie médicale – Exigences concernant la qualité et la compétence, 2012.
3. COFRAC. SH-INF-50. Portées-types d'accréditation. Révision 04, 2017.
4. COFRAC. SH-REF-02 : exigences pour l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189. Révision 05, 2016.
5. COFRAC. SH GTA 05 : guide technique d'accréditation en biologie de la reproduction. Révision 00, 2016.
6. Poncelet C, Sifer C. *Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*. Springer Science & Business Media, 2011 (515 p.).
7. COFRAC. SH-FORM-43 : fiche type de vérification (portée A)/validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale.
8. COFRAC. SH GTA 04 : guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. Révision 01, 2015.
9. The Lifeglobal® Group [Internet]. Disponible sur : <http://www.lifeglobalgroup.com/global.shtml>.
10. Vassault A, Grafmeyer D, de Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation des techniques. *Ann Biol Clin* 1999 ; 57 : 685-95.
11. Hentemann M, Mousavi K, Bertheussen K. Differential pH in embryo culture. *Fertil Steril* 2011 ; 95 : 1291-4.
12. Edwards LJ, Williams DA, Gardner DK. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Hum Reprod* 1998 ; 13 : 3441-8.
13. Phillips KP. Intracellular pH regulation in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2000 ; 15 : 896-904.
14. Swain JE. Is there an optimal pH for culture media used in clinical IVF? *Hum Reprod Update* 2012 ; 18 : 333-9.
15. Dale B, Menezo Y, Cohen J, DiMatteo L, Wilding M. Intracellular pH regulation in the human oocyte. *Hum Reprod* 1998 ; 13 : 964-70.
16. COFRAC. SH-GTA-01 : guide technique d'accréditation en biologie médicale. Révision 01, 2015.