



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**DOUBLE**  
1835

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1  
2005

FACULTE DE MEDECINE  
N° 82

**MEMOIRE  
DU DIPLOME D' ETUDES SPECIALISEES DE  
BIOLOGIE MEDICALE**

Présenté et soutenu publiquement  
le 28 Septembre 2005  
par  
**Nadège GAMBERT**



**IMPACT DU TABAGISME ACTIF ET PASSIF  
SUR LES CARACTERISTIQUES DE LA ZONE PELLUCIDE  
DES OVOCYTES HUMAINS.**

Conformément aux dispositions du décret n° 90-810  
du 10 Septembre 1990, ce mémoire tient lieu de

**THESE  
POUR LE DIPLÔME D' ETAT DE  
DOCTEUR EN MEDECINE**

**JURY**

<b>M.</b>	<b>Professeur H. GERARD</b>	<b>Président</b>
<b>Mme</b>	<b>Professeur M. M. GALTEAU</b>	<b>} Juges</b>
<b>M.</b>	<b>Professeur G. SIEST</b>	<b>}</b>
<b>M.</b>	<b>Professeur J.L. GUEANT</b>	<b>}</b>
<b>Mme</b>	<b>Docteur J. MANDELBAUM</b>	<b>}</b>





**MEMOIRE  
DU DIPLOME D' ETUDES SPECIALISEES DE  
BIOLOGIE MEDICALE**

Présenté et soutenu publiquement  
le 28 Septembre 2005  
par  
Nadège GAMBERT



**IMPACT DU TABAGISME ACTIF ET PASSIF  
SUR LES CARACTERISTIQUES DE LA ZONE PELLUCIDE  
DES OVOCYTES HUMAINS.**

Conformément aux dispositions du décret n° 90-810  
du 10 Septembre 1990, ce mémoire tient lieu de

**THESE  
POUR LE DIPLÔME D' ETAT DE  
DOCTEUR EN MEDECINE**

**JURY**

<b>M.</b>	<b>Professeur H. GERARD</b>	<b>Président</b>
<b>Mme</b>	<b>Professeur M. M. GALTEAU</b>	<b>} Juges</b>
<b>M.</b>	<b>Professeur G. SIEST</b>	<b>}</b>
<b>M.</b>	<b>Professeur J.L. GUEANT</b>	<b>}</b>
<b>Mme</b>	<b>Docteur J. MANDELBAUM</b>	<b>}</b>

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

-----  
Président de l'Université : Professeur Jean-Pierre FINANCE

Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Patrick NETTER

Vice-Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE

Assesseurs

du 1<sup>er</sup> Cycle :

du 2<sup>ème</sup> Cycle :

du 3<sup>ème</sup> Cycle :

de la Vie Facultaire :

Mme le Docteur Chantal KOHLER

Mr le Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI

Mr le Professeur Hervé VESPIGNANI

Mr le Professeur Bruno LEHEUP

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX

Professeur Jacques ROLAND

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

Louis PIERQUIN – Etienne LEGAIT – Jean LOCHARD – René HERBEUVAL – Gabriel FAIVRE – Jean-Marie FOLIGUET  
Guy RAUBER – Paul SADOUL – Raoul SENAULT – Marcel RIBON  
Jacques LACOSTE – Jean BEUREY – Jean SOMMELET – Pierre HARTEMANN – Emile de LAVERGNE  
Augusta TREHEUX – Michel MANCIAUX – Paul GUILLEMIN – Pierre PAYSANT  
Jean-Claude BURDIN – Claude CHARDOT – Jean-Bernard DUREUX – Jean DUHEILLE – Jean-Pierre GRILLIAT  
Pierre LAMY – Jean-Marie GILGENKRANTZ – Simone GILGENKRANTZ  
Pierre ALEXANDRE – Robert FRISCH – Michel PIERSON – Jacques ROBERT  
Gérard DEBRY – Pierre TRIDON – Michel WAYOFF – François CHERRIER – Oliéro GUERCI  
Gilbert PERCEBOIS – Claude PERRIN – Jean PREVOT – Jean FLOQUET  
Alain GAUCHER – Michel LAXENAIRE – Michel BOULANGE – Michel DUC – Claude HURIET – Pierre LANDES  
Alain LARCAN – Gérard VAILLANT – Daniel ANTHOINE – Pierre GAUCHER – René-Jean ROYER  
Hubert UFFHOLTZ – Jacques LECLERE – Francine NABET – Jacques BORRELLY  
Michel RENARD – Jean-Pierre DESCHAMPS – Pierre NABET – Marie-Claire LAXENAIRE – Adrien DUPREZ – Paul VERT  
Philippe CANTON – Bernard LEGRAS – Pierre MATHIEU – Jean-Marie POLU – Antoine RASPILLER – Gilbert THIBAUT  
Michel WEBER – Gérard FIEVE – Daniel SCHMITT – Colette VIDAILHET – Alain BERTRAND – Jean-Pierre NICOLAS –  
Francis PENIN – Michel STRICKER – Daniel BURNEL – Michel VIDAILHET – Francis PENIN

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS -  
PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42<sup>ème</sup> Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1<sup>ère</sup> sous-section : (*Anatomie*)

Professeur Jacques ROLAND – Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Pierre LASCOMBES – Professeur Marc BRAUN

2<sup>ème</sup> sous-section : (*Cytologie et histologie*)

Professeur Bernard FOLIGUET

3<sup>ème</sup> sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)

Professeur François PLENAT - Professeur Jean-Michel VIGNAUD

-----

43<sup>ème</sup> Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1<sup>ère</sup> sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2<sup>ème</sup> sous-section : (*Radiologie et imagerie médicale*)

Professeur Luc PICARD – Professeur Denis REGENT - Professeur Michel CLAUDON

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM - Professeur Jacques FELBLINGER

Professeur René ANXIONNAT

-----

**44<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)**

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Physiologie)**

Professeur Jean-Pierre CRANCE – Professeur Jean-Pierre MALLIE

Professeur François MARCHAL – Professeur Philippe HAOUZI

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Biologie cellulaire)**

Professeur Claude BURLET

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Nutrition)**

Professeur Olivier ZIEGLER

-----

**45<sup>ème</sup> Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)**

Professeur Alain LOZNIIEWSKI

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Parasitologie et mycologie)**

Professeur Bernard FORTIER

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)**

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

-----

**46<sup>ème</sup> Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)**

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON

Professeur Francis GUILLEMIN – Professeur Denis ZMIROU-NAVIER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine et santé au travail)**

Professeur Guy PETIET – Professeur Christophe PARIS

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)**

Professeur Henry COUDANE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)**

Professeur François KOHLER – Professeur Éliane ALBUISSON

-----

**47<sup>ème</sup> Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Hématologie ; transfusion)**

Professeur Christian JANOT – Professeur Thomas LECOMPTE – Professeur Pierre BORDIGONI

Professeur Pierre LEDERLIN – Professeur Jean-François STOLTZ

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)**

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY

Professeur Pierre BEY – Professeur Didier PEIFFERT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Immunologie)**

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Génétique)**

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

-----

**48<sup>ème</sup> Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,  
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Anesthésiologie et réanimation chirurgicale)**

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Dan LONGROIS - Professeur Hervé BOUAZIZ

Professeur Paul-Michel MERTES

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Réanimation médicale)**

Professeur Henri LAMBERT – Professeur Alain GERARD

Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT – Professeur Bruno LÉVY

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)**

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Thérapeutique)**

Professeur François PAILLE – Professeur Gérard GAY – Professeur Faiez ZANNAD

-----

**49<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP et RÉÉDUCATION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Neurologie)**

Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Hervé VESPIGNANI

Professeur Xavier DUCROCQ

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Neurochirurgie)**

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE

Professeur Thierry CIVIT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Psychiatrie d'adultes)**

Professeur Jean-Pierre KAHN

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Pédopsychiatrie)**

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC

**5<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)**

Professeur Jean-Marie ANDRE

-----

**50<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Rhumatologie)**

Professeur Jacques POUREL – Professeur Isabelle VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)**

Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE – Professeur Daniel MOLE

Professeur Didier MAINARD – Professeur François SIRVEAUX

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Dermato-vénérologie)**

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique)**

Professeur François DAP

-----

**51<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE CARDIORESPIRATOIRE et VASCULAIRE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Pneumologie)**

Professeur Yves MARTINET - Professeur Jean-François CHABOT

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cardiologie)**

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE – Professeur Nicolas SADOUL –

Professeur Christian de CHILLOU

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)**

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT

Professeur Jean-Pierre CARTEAUX – Professeur Loïc MACE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)**

-----

**52<sup>ème</sup> Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie)**

Professeur Marc-André BIGARD

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie digestive)**

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Néphrologie)**

Professeur Michèle KESSLER – Professeur Dominique HESTIN (Mme) – Professeur Luc FRIMAT

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Urologie)**

Professeur Philippe MANGIN – Professeur Jacques HUBERT – Professeur Luc CORMIER

-----

**53<sup>ème</sup> Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Médecine interne)**

Professeur Denise MONERET-VAUTRIN – Professeur Denis WAHL

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY

Professeur Athanase BENETOS - Professeur Gisèle KANNY – Professeur Abdelouahab BELLOU

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie générale)**

Professeur Patrick BOISSEL – Professeur Laurent BRESLER

Professeur Laurent BRUNAUD

-----

**54<sup>ème</sup> Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE,  
ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Pédiatrie)**

Professeur Danièle SOMMELET – Professeur Pierre MONIN

Professeur Jean-Michel HASCOET – Professeur Pascal CHASTAGNER – Professeur François FEILLET

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie infantile)**

Professeur Michel SCHMITT – Professeur Gilles DAUTEL – Professeur Pierre JOURNEAU

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)**

Professeur Michel SCHWEITZER – Professeur Jean-Louis BOUTROY

Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Patricia BARBARINO – Professeur Bruno DEVAL

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Endocrinologie et maladies métaboliques)**

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

**5<sup>ème</sup> sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction)**

Professeur Hubert GERARD

-----

**55<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)**

Professeur Claude SIMON – Professeur Roger JANKOWSKI

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Ophtalmologie)**

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeur Karine ANGIOI-DUPREZ

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)**

Professeur Jean-François CHASSAGNE

=====

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS**

**64<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

Professeur Sandrine BOSCHI-MULLER

Professeur Franck DALIGAULT

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

**42<sup>ème</sup> Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Anatomie)**

Docteur Bruno GRIGNON

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cytologie et histologie)**

Docteur Edouard BARRAT

Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)**

Docteur Béatrice MARIE

Docteur Laurent ANTUNES

-----

**43<sup>ème</sup> Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)**

Docteur Marie-Hélène LAURENS – Docteur Jean-Claude MAYER

Docteur Pierre THOUVENOT – Docteur Jean-Marie ESCANYE – Docteur Amar NAOUN

-----

**44<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)**

Docteur Jean STRACZEK – Docteur Sophie FREMONT

Docteur Isabelle GASTIN – Docteur Bernard NAMOUR – Docteur Marc MERTEN

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Physiologie)**

Docteur Gérard ETHEVENOT – Docteur Nicole LEMAU de TALANCE – Docteur Christian BEYAERT

Docteur Bruno CHENUÉL

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Nutrition)**

Docteur Didier QUILLIOT

-----

**45<sup>ème</sup> Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)**

Docteur Francine MORY – Docteur Christine LION

Docteur Michèle DAILLOUX – Docteur Véronique VENARD

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Parasitologie et mycologie)**

Docteur Marie-France BIAVA – Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU

**46<sup>ème</sup> Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Epidémiologie, économie de la santé et prévention)**

Docteur François ALLA

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)**

Docteur Pierre GILLOIS

-----

**47<sup>ème</sup> Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Hématologie ; transfusion)**

Docteur François SCHOONEMAN

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Immunologie)**

Docteur Anne KENNEL

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Génétique)**

Docteur Christophe PHILIPPE

-----

**48<sup>ème</sup> Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,  
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Anesthésiologie et réanimation chirurgicale)**

Docteur Jacqueline HELMER – Docteur Gérard AUDIBERT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)**

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT

-----

**49<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET  
RÉÉDUCATION**

**5<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)**

Docteur Jean PAYSANT

-----

**54<sup>ème</sup> Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE,  
ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

**5<sup>ème</sup> sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction)**

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES**

**05<sup>ème</sup> section : SCIENCE ÉCONOMIE GÉNÉRALE**

Monsieur Vincent LHUILLIER

-----

**32<sup>ème</sup> section : CHIMIE ORGANIQUE, MINÉRALE, INDUSTRIELLE**

Monsieur Jean-Claude RAFT

-----

**40<sup>ème</sup> section : SCIENCES DU MÉDICAMENT**

Monsieur Jean-François COLLIN

-----

**60<sup>ème</sup> section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE**

Monsieur Alain DURAND

-----

**61<sup>ème</sup> section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL**

Monsieur Jean REBSTOCK – Monsieur Walter BLONDEL

-----

**64<sup>ème</sup> section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

Mademoiselle Marie-Claire LANHERS

-----

**65<sup>ème</sup> section : BIOLOGIE CELLULAIRE**

Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY

Madame Ketsia HESS – Monsieur Pierre TANKOSIC – Monsieur Hervé MEMBRE

**67<sup>ème</sup> section : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ÉCOLOGIE**  
Madame Nadine MUSSE

-----

**68<sup>ème</sup> section : BIOLOGIE DES ORGANISMES**  
Madame Tao XU-JIANG

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS**

**Médecine Générale**  
Docteur Alain AUBREGE  
Docteur Francis RAPHAEL  
Docteur Jean-Marc BOIVIN

=====

**PROFESSEURS ÉMÉRITES**

Professeur Michel BOULANGE - Professeur Alain LARCAN - Professeur Michel WAYOFF Professeur Daniel ANTHOINE -  
Professeur Hubert UFFHOLTZ – Professeur Adrien DUPREZ - Professeur Paul VERT  
Professeur Jean PREVOT – Professeur Jean-Pierre GRILLIAT - Professeur Philippe CANTON – Professeur Pierre MATHIEU  
Professeur Gilbert THIBAUT - Professeur Daniel SCHMITT – Mme le Professeur Colette VIDAILHET –  
Professeur Jean FLOQUET – Professeur Claude CHARDOT – Professeur Michel PIERSON – Professeur Alain BERTRAND –  
Professeur Daniel BURNEL – Professeur Jean-Pierre NICOLAS – Professeur Michel VIDAILHET

=====

**DOCTEURS HONORIS CAUSA**

Professeur Norman SHUMWAY (1972)  
*Université de Stanford, Californie (U.S.A)*  
Professeur Paul MICHELSEN (1979)  
*Université Catholique, Louvain (Belgique)*  
Professeur Charles A. BERRY (1982)  
*Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)*  
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)  
*Brown University, Providence (U.S.A)*  
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)  
*Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)*  
Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)  
*Wanderbilt University, Nashville (U.S.A)*  
Harry J. BUNCKE (1989)  
*Université de Californie, San Francisco (U.S.A)*

Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)  
*Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)*  
Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)  
*Université de Pennsylvanie (U.S.A)*  
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)  
*Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)*  
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)  
*Université d'Helsinki (FINLANDE)*  
Professeur James STEICHEN (1997)  
*Université d'Indianapolis (U.S.A)*  
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)  
*Centre Universitaire de Formation et de Perfectionnement des  
Professionnels de Santé d'Hô Chi Minh-Ville (VIËTNAM)*

# **DEDICACES**

**A notre Maître et Président de thèse,**

**Monsieur le Professeur Hubert Gérard**

**Professeur de Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction**

**Vous m'avez accueillie dans votre service pour m'initier et approfondir mes connaissances en Médecine de la Reproduction.**

**Merci de m'avoir fait partager votre expérience.**

**Merci de présider mon jury et de juger ce travail.**

**A mes Maîtres et juges,**

**Madame le Professeur Marie Madeleine GALTEAU**

**Professeur de Biochimie clinique**

**Merci d'avoir manifesté un grand intérêt pour mon travail et de m'avoir fait bénéficier de vos connaissances.**

**Vos conseils ont été fort précieux, comme ceux de Vanina.**

**Merci d'avoir accepté de juger mon travail.**

**Monsieur le Professeur Gérard SIEST**

**Professeur de Biochimie clinique**

**Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez montré à l'égard de ce travail et vous remercie d'avoir accepté de le juger.**

**Monsieur le Professeur Jean Louis GUEANT**

**Professeur de Biochimie**

**Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire durant 2 semestres.**

**Merci de m'avoir initié à la recherche dans votre laboratoire de la faculté.**

**Merci de m'avoir permis de poursuivre mon chemin en Biologie de la Reproduction et pour vos encouragements.**

**A mon Directeur de thèse,**

**Madame le Docteur Jacqueline MANDELBAUM**

**Chef de service du laboratoire de Biologie de la Reproduction (Hôpital Tenon, Paris)**

**Vous m'avez accueillie dans votre service pendant un semestre afin d'approfondir mes connaissances en Médecine de la Reproduction.**

**Merci pour votre savoir, vos compétences, votre grande rigueur, vos conseils précieux et pertinents, votre disponibilité, vos encouragements et votre gentillesse.**

**J'ai eu beaucoup de chance de faire partie de votre équipe.**

**Grâce à vos recommandations, je vais poursuivre mon chemin dans le laboratoire du Docteur Clément.**

**Merci infiniment d'être venue juger mon travail à Nancy.**

**Que cette thèse soit le gage de ma profonde considération et de ma reconnaissance.**

**A toute l'équipe du laboratoire de Biologie de la Reproduction, Michelle, Nathalie, Fabienne, Jeannette et Philippe. Vous m'avez permis de passer un semestre formidable et enrichissant.**

**A Vanina, merci de ton amitié, de ton soutien et de tes précieux conseils.**

**A Isabelle, merci de ton aide "statistique" et de ta bonne humeur.**

**A Célia, merci pour tes conseils et tes encouragements.**

**Au Docteur Millot, pour son aide « biochimique »**

**Au laboratoire DPC, merci d'avoir réaliser les dosages de métabolites de la cotinine des sérums et des fluides folliculaires de mes patientes.**

**A mes parents : il y a 30 et 31 ans, maman et papa, vous passiez votre thèse, c'est à mon tour à présent.... Merci pour votre soutien sans faille depuis toutes ces années.**

**A Stéphane : avec tout mon Amour,**

**Tu auras partagé mes quatre années d'internat. Voilà, je ne serai plus ta petite étudiante !**

**A Ségolène et Armelle : merci de votre patience et de vos encouragements lors des étapes de ma vie d'étudiante**

**A Mamie et Papy : mes professeurs préférés, je passe aujourd'hui ma thèse à Nancy, où vous vous êtes rencontrés il y a .....**

**A Monsieur et Madame Naigeon : mes grands parents de cœur, merci de votre affection.**

**A mes « futurs » beaux-parents : merci pour votre soutien et votre présence.**

**A ma marraine, mon parrain (et à Anne) et à Papo : votre présence me touche énormément.**

**A Céline : j'espère que notre amitié résistera à la distance !**

**A mes amis .**

## SERMENT

*"Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.*

*Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.*

*Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.*

*J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.*

*Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque".*

# TABLE DES MATIERES

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION:</b> .....	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>LE POINT SUR LA QUESTION :</b> .....	<b>20</b>
2.1	RETENTISSEMENT DU TABAGISME SUR LA FERTILITE FEMININE :.....	20
2.1.1	<i>Conséquences sur la fertilité naturelle :</i> .....	20
2.1.2	<i>Conséquences sur la fertilité en AMP :</i> .....	22
2.1.3	<i>Niveaux d'impact du tabagisme :</i> .....	23
2.1.3.1	<b>Impact tubaire : risque de grossesse extra-utérine :</b> .....	23
2.1.3.2	<b>Impact ovarien :</b> .....	26
2.1.3.2.1	<i>Réserve ovarienne :</i> .....	26
2.1.3.2.2	<i>L'intoxication tabagique folliculaire :</i> .....	28
2.1.3.2.3	<i>L'ovocyte :</i> .....	29
2.1.3.2.3.1	<i>Maturation nucléaire :</i> .....	29
2.1.3.2.3.2	<i>La Zone Pellucide :</i> .....	30
2.1.3.3	<b>Action sur l'implantation et le déroulement de la grossesse :</b> .....	37
2.2	COMMENT EVALUER L'IMPREGNATION TABAGIQUE ?.....	39
2.2.1	<i>Les composants de la fumée de cigarette :</i> .....	39
2.2.1.1	<b>Le monoxyde de carbone (CO):</b> .....	40
2.2.1.2	<b>Les substances carcinogènes :</b> .....	41
2.2.1.3	<b>Les substances irritantes :</b> .....	41
2.2.1.4	<b>La nicotine :</b> .....	42
2.2.1.4.1	<i>Apport en nicotine :</i> .....	42
2.2.1.4.2	<i>Effets pharmacologiques de la nicotine :</i> .....	42
2.2.1.4.3	<i>Absorption et distribution de la nicotine :</i> .....	43
2.2.1.4.4	<i>Fixation aux récepteurs de la nicotine :</i> .....	43
2.2.1.4.5	<i>Métabolisme de la nicotine :</i> .....	44
2.2.1.4.6	<i>Pharmacocinétique de la nicotine :</i> .....	45

2.2.1.5	<b>La cotinine</b> .....	46
2.2.1.5.1	<i>Pharmacocinétique de la cotinine</i> : .....	46
2.2.1.5.2	<i>Les milieux biologiques de dosage de la cotinine</i> : .....	47
2.2.1.5.2.1	La cotinine plasmatique : .....	47
2.2.1.5.2.2	La cotinine urinaire : .....	47
2.2.1.5.2.3	La cotinine salivaire : .....	48
2.2.2	<i>La consommation de tabac</i> : .....	49
2.2.2.1	<b>Epidémiologie</b> : .....	49
2.2.2.2	<b>Définir le tabagisme (actif ou passif)</b> : .....	51
2.2.2.2.1	<i>L'interrogatoire permet de différencier 2 types de tabagisme : l'un actif, l'autre passif.</i> .....	51
2.2.2.2.2	<i>Mesures de l'imprégnation tabagique</i> .....	52
2.2.2.2.2.1	L'analyseur de monoxyde de carbone dans l'air expiré : .....	52
2.2.2.2.2.2	Le dosage des thiocyanates : .....	55
2.2.2.2.2.3	Les techniques de dosage de la nicotine et de ses métabolites : .....	55
2.2.2.2.2.4	Utilisation des techniques de dosages des métabolites de la nicotine : .....	60
<b>3</b>	<b>MATERIELS ET METHODES</b> : .....	<b>64</b>
3.1	PATIENTES : .....	64
3.2	PROTOCOLE DE STIMULATION : .....	64
3.3	PONCTION OVOCYTAIRE : .....	65
3.4	PREPARATION DU SPERME : .....	65
3.5	ICSI : .....	65
3.6	FIV : .....	66
3.7	OBSERVATION DES ZYGOTES : .....	66
3.8	SUIVI DES EMBRYONS : .....	66
3.9	MESURE DES CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DE LA ZP : .....	67
3.9.1	<i>Epaisseur de la ZP</i> : .....	67
3.9.2	<i>Résistance de la ZP</i> : .....	67
3.10	TRANSFERT ET MESURE DU TAUX DE CO: .....	67
3.11	DOSAGE DES METABOLITES DE LA COTININE DANS LE SERUM ET LE FLUIDE FOLLICULAIRE : .....	68
3.12	STATISTIQUES : .....	68
3.13	DECISION D'ECLOSION ASSISTEE : .....	69
3.14	APPARIEMENT DES POPULATIONS : .....	69
3.15	RESULTATS DES FIV : .....	69

<b>4</b>	<b>RESULTATS :</b> .....	<b>70</b>
4.1	POPULATION FUMEUSES ACTIVES :.....	70
4.1.1	<i>caractéristiques des populations étudiées :</i> .....	70
4.1.2	<i>Imprégnation tabagique :</i> .....	71
4.1.3	<i>Caractéristiques physicochimiques de la ZP :</i> .....	72
4.1.4	<i>Résultats de la FIV :</i> .....	73
4.1.5	<i>Effet de l'observation :</i> .....	74
4.2	POPULATION FUMEUSES PASSIVES DOMESTIQUES :.....	75
4.2.1	<i>Caractéristiques des populations étudiées :</i> .....	75
4.2.2	<i>Imprégnation tabagique :</i> .....	76
4.2.3	<i>Caractéristiques physicochimiques de la ZP :</i> .....	76
4.2.4	<i>Résultats de la FIV :</i> .....	77
4.3	POPULATION FUMEUSES PASSIVES ENVIRONNEMENT :.....	78
<b>5</b>	<b>DISCUSSION :</b> .....	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSION :</b> .....	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE :</b> .....	<b>83</b>

# **IMPACT DU TABAGISME ACTIF ET PASSIF SUR LES CARACTERISTIQUES DE LA ZONE PELLUCIDE DES OVOCYTES HUMAINS.**

## **1 INTRODUCTION:**

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que le tabagisme était associé à une diminution de la fertilité naturelle et des résultats obtenus en AMP (Assistance Médicale à la Procréation). Chez la femme, le tabagisme pourrait altérer le fonctionnement tubaire, la réserve ovarienne en follicules, la qualité ovocytaire, l'implantation ainsi que le déroulement de la grossesse. La zone pellucide (ZP), qui joue un rôle important dans les processus de fécondation et d'implantation pourrait être modifiée par ce type d'intoxication.

Une récente étude (Shiloh *et al*, (1)) a évalué l'impact du tabagisme actif et passif sur l'épaisseur de la ZP des ovocytes et des embryons humains et a montré qu'elle était chez les fumeuses passives et actives significativement plus épaisse que celle observée chez les non fumeuses. Ces modifications pourraient gêner la pénétration du spermatozoïde et les capacités d'éclosion de l'embryon. Dans cette étude, on peut noter que l'évaluation tabagique ne reposait que sur l'interrogatoire.

Le but de ce travail est de réaliser une étude prospective du retentissement du tabagisme actif et passif (évalué objectivement par le dosage des métabolites de la cotinine dans le sérum et le fluide folliculaire), sur d'une part les caractéristiques physico-chimiques de la ZP de l'ovocyte et d'autre part sur les capacités d'implantation des embryons issus de ces ovocytes.

## **2 Le point sur la question :**

### **2.1 Retentissement du tabagisme sur la fertilité féminine :**

Selon un rapport de l'OMS de 1997 (2), plus du tiers de la population mondiale âgée de plus de 15 ans fume. En ce qui concerne notre pays, 30% des Françaises fument, ce pourcentage dépasse les 50% pour les femmes âgées de 18 à 25 ans et l'on constate un abaissement considérable de l'âge de l'initiation au tabagisme puisqu'un tiers des jeunes françaises fument déjà avant l'âge de 15 ans (3) . Ces quelques chiffres expliquent pourquoi le tabagisme féminin est considéré, aujourd'hui, comme un problème de santé publique.

Si les conséquences du tabagisme sur les pathologies cancéreuses et cardio-vasculaires sont assez bien évaluées, il n'en est pas de même pour le retentissement du tabac sur la fertilité.

#### **2.1.1 Conséquences sur la fertilité naturelle :**

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que de manière dose-dépendante, la consommation de tabac réduit la **fertilité féminine** (Bolumar *et al* (4)).

En effet, cette étude européenne, réalisée chez des femmes ayant accouché récemment, a montré que le pourcentage de femmes ayant obtenu leur grossesse en plus de 9 mois passait de 19% pour les non fumeuses à 30% pour celles fumant plus de 10 cigarettes par jour. La durée d'infécondité était ainsi multipliée par 1.6.

Dans une étude française prospective de cohorte (de Mouzon *et al* (8)), réalisée chez 1887 couples le pourcentage cumulatif de grossesses à un an était de 15% inférieur chez les fumeuses par rapport aux non fumeuses (70% contre 85%) de manière proche de la significativité ( $p=0,06$ ).

Par ailleurs, Augood *et al* (5) ont sélectionné 12 études parmi les 24 recensées de 1968 à 1997 pour réaliser une méta-analyse sur l'augmentation du **risque de stérilité** chez les femmes fumeuses par rapport aux non fumeuses. Dans cette population totale de 30 000 femmes (comprenant 10 928 sujets exposés au tabagisme et 19 179 non exposés), l'élévation du risque de stérilité chez les fumeuses est statistiquement significatif par rapport aux non fumeuses (OR (odds ratio)= 1.60 avec IC (intervalle de confiance) de 1.34 à 1.91 pour  $p=0.05$ ).

Les résultats de cette méta-analyse concernant l'augmentation du risque de stérilité chez les fumeuses par rapport aux non fumeuses sont représentés dans le tableau I.

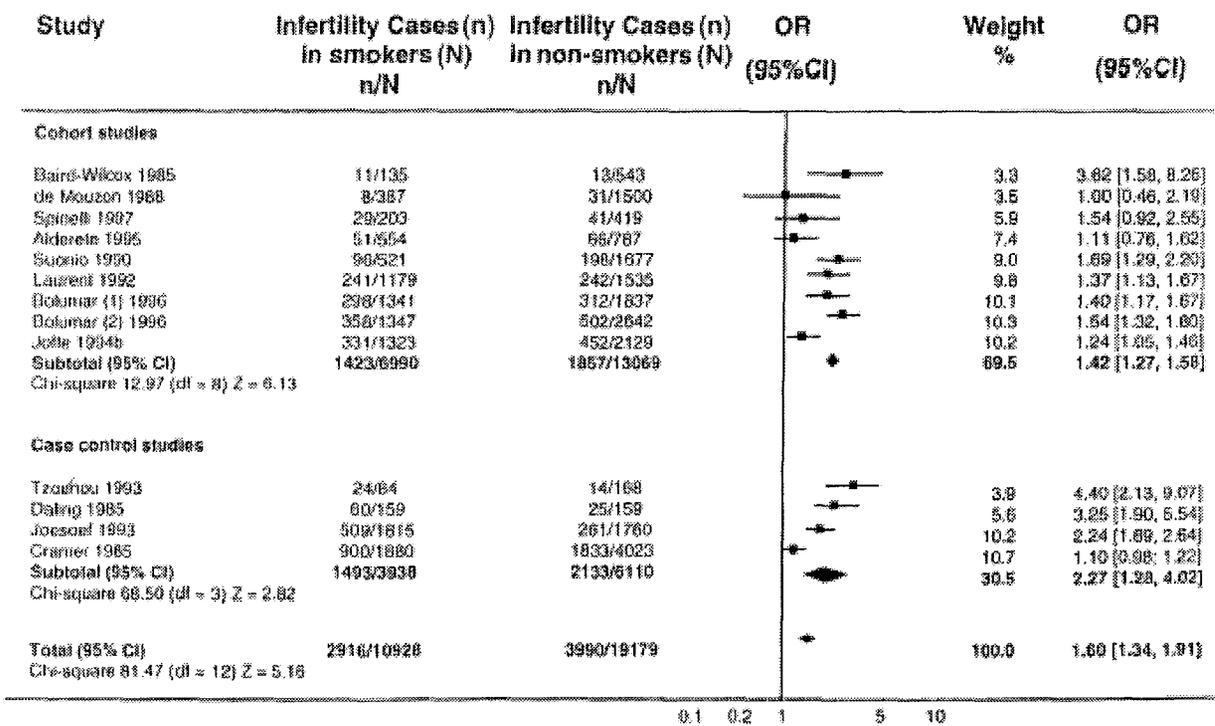


Tableau I : Méta-analyse de Augood *et al* (5) comparant le risque de stérilité entre fumeuses et non fumeuses.

De plus, dans cette même méta-analyse, Augood *et al* (5) ont montré que le **taux de conception par cycle** naturel était diminué de 72% pour les fumeuses comparé aux non fumeuses.

L'étude de Hull *et al* (6) sur 14 893 grossesses, confirme ces données et montre que non seulement le tabagisme actif mais aussi le tabagisme passif est associé à un retard à la conception indépendamment des facteurs tubaires d'infertilité. En effet, un retard, supérieur à 6 mois, est observé de façon statistiquement significative chez les fumeuses actives mais aussi chez les fumeuses passives par rapport aux non fumeuses (respectivement OR= 1,23 et 1,17 avec IC à 95% allant de 0,98 à 1,49 et de 1,02 à 1,37). De plus, le tabagisme actif du conjoint a des effets délétères plus importants que le tabagisme passif lié à l'environnement. Ce retard à la conception s'accroît avec l'importance de la consommation tabagique (effet dose).

Weinberg *et al* (7) ont étudié la fécondité des femmes ayant été exposées *in utero* à une intoxication tabagique maternelle. Il a étudié 217 couples dont les conjointes avaient été exposées au tabagisme *in utero* dans 78 cas et ne l'avaient pas été dans 139 cas. Le taux de fécondité des femmes exposées était diminué de moitié par rapport à celui des femmes non exposées (OR=0.5, IC à 95% : 0,4 - 0,8). L'hypothèse des auteurs privilégie une altération de la réserve ovarienne dès la vie intra-utérine, par l'intoxication tabagique maternelle.

### **2.1.2 Conséquences sur la fertilité en AMP :**

L'AMP permet d'analyser le retentissement du tabagisme non seulement sur le caractère fécond ou non des cycles, mais également sur la qualité des gamètes et des embryons.

A partir de 9 études de protocole de fécondation *in vitro* (FIV) réalisées entre 1986 et 1996 et concernant plus de 2 000 femmes, une méta-analyse réalisée par Augood *et al* (5) conclut à la diminution des chances de grossesse par cycle de FIV chez les fumeuses, par rapport aux non fumeuses, qui se traduit par un odds ratio de 0.66 (IC : 0.49 - 0.88).

Une cohorte prospective sur 5 ans menée par Klonoff-Cohen *et al* (9) sur 221 couples traités pour infertilité a mis en évidence une réduction de l'efficacité des traitements chez les fumeuses. Le risque relatif (RR) des fumeuses, au cours de leur vie, de ne pas réussir à être enceintes par FIV était de 2,71 (IC : 1,37-5,35) et pour les couples fumeurs depuis plus de 5 ans, le RR de ne pas aboutir à une naissance était de 4,27 (IC : 1,53-11,97).

A la différence des études précédemment citées, d'autres travaux basés sur des données objectives (dosage de la cotinine dans le fluide folliculaire ou le plasma) ne retrouvent pas d'effet délétère du tabagisme sur les taux de grossesses.

Dans l'étude prospective de Hugues *et al* (10), l'exposition tabagique a été validée par un dosage de cotinine sérique, taux fortement corrélé au nombre de cigarettes fumées par jour. Les taux de fécondation, de grossesse et de fausse couche des couples bénéficiant de protocole de FIV ne sont pas significativement différents entre le groupe des fumeuses actives et celui des non fumeuses. La probabilité de chance de transfert d'un embryon à 4 cellules ou plus est similaire entre les fumeuses et les non fumeuses (OR= 0.90 pour IC à 95% de 0.66 à 1.2). Leurs résultats ne dépassent cependant pas 15% de grossesse clinique par

ponction. On remarque dans cette étude, une corrélation négative entre le taux de cotinine et le taux d'oestradiol pour toutes les patientes ( $r = -0.65$  pour  $p < 0.01$ ).

Dans l'étude prospective de Sterzik *et al* (11), l'exposition tabagique a été contrôlée par le dosage de la cotinine dans le fluide folliculaire. Seules les patientes ayant une infertilité tubaire et des cycles ovulatoires ont été incluses dans ce protocole de FIV. Les taux de fécondation (respectivement 67.9, 57.7 et 67.6 %) et de grossesses cliniques par ponction (respectivement 32.9, 33.3 et 32.6 %) ne sont pas significativement différents entre les groupes fumeuses actives ( $n = 103$ ), fumeuses passives ( $n = 26$ ) et non fumeuses ( $n = 68$ ).

### **2.1.3 Niveaux d'impact du tabagisme :**

#### **2.1.3.1 Impact tubaire : risque de grossesse extra-utérine :**

Il existe une association entre la survenue de grossesse extra-utérine (GEU) et le tabagisme. En effet, l'étude cas-témoin (12), réalisée chez 1315 femmes américaines, a mis en évidence un effet dose ( $OR = 3,5$  ;  $IC$  à 95% : 1,4 - 8,6) pour la survenue d'une GEU chez les femmes fumant plus de 11 cigarettes quotidiennement par rapport aux non fumeuses.

Des études expérimentales réalisées par l'équipe de Knoll et Talbot (13, 14), *in vitro* et *in vivo* sur le hamster ont permis de mettre en évidence les effets délétères du tabac sur la fonction tubaire par différents mécanismes.

Talbot *et al* (13) ont étudié la contractilité musculaire tubaire chez 7 hamsters exposés au tabac par inhalation (doses différentes permettant de se rapprocher du tabagisme passif et actif) et chez 3 hamsters témoins non exposés. Il existe une différence significative de contractilité musculaire dans les différents groupes avec un ralentissement d'autant plus grand que l'exposition tabagique était importante (tabagisme actif).

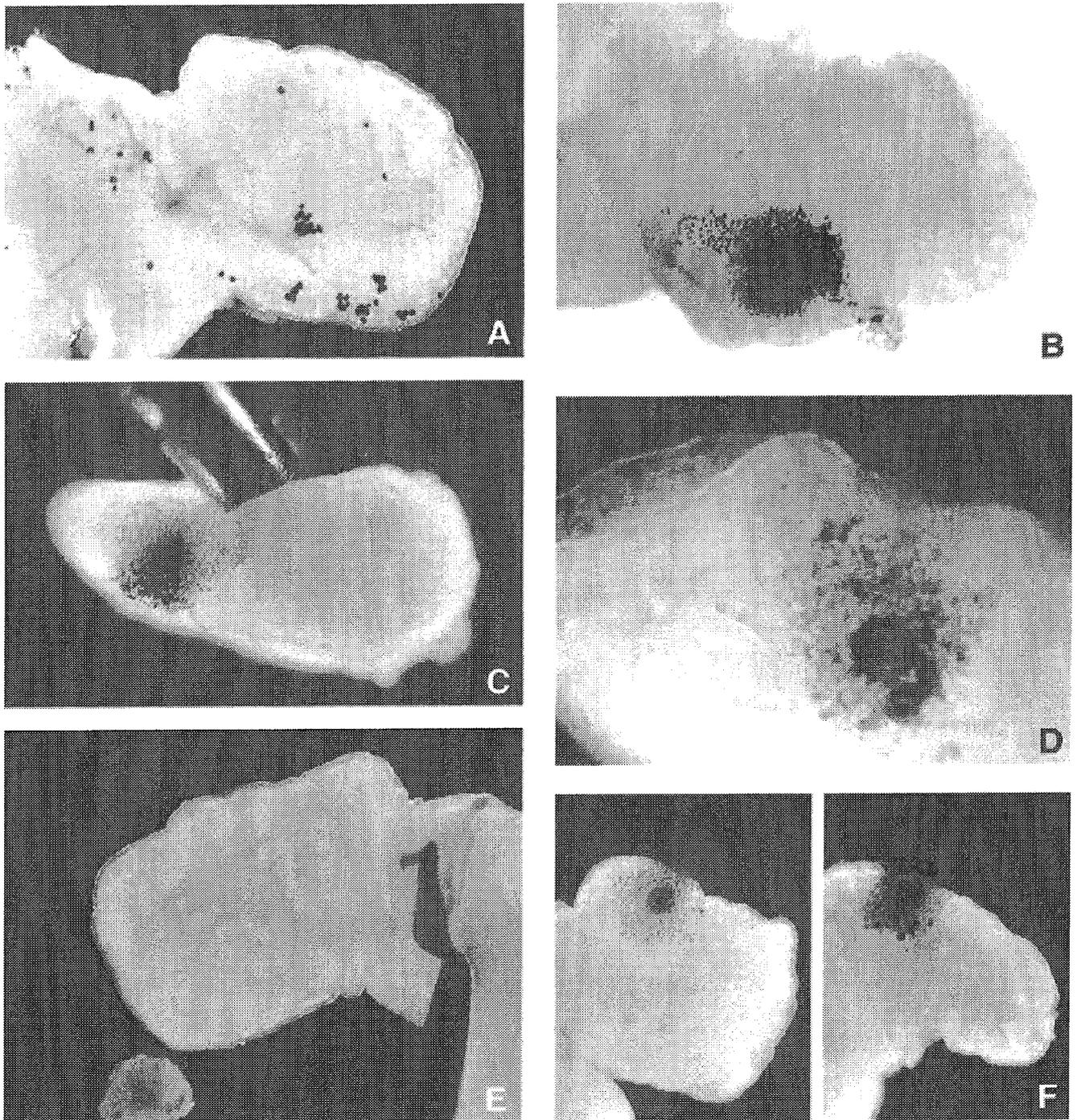
Dans cette même étude, le transit tubaire de l'œuf fécondé a été évaluée par des salpingectomies réalisées au 3<sup>ème</sup> jour de grossesse, après pose de ligatures aux 2 extrémités des trompes, dans 2 groupes exposés au tabac (équivalent tabagisme actif et passif déterminé par le dosage de la cotinine). Une imprégnation tabagique très faible suffit à ralentir le transit tubaire de l'œuf fécondé (70 % en cas d'exposition correspondant à 2 cigarettes par jour).

Knoll et al (14) ont analysé *in vitro* la captation du complexe cumulo-ovocytaire (CCO) dans la trompe de hamster isolée, placée dans un environnement ventilé ou non par de la fumée de cigarettes, ainsi que la fréquence des battements ciliaires. Le temps de captation des CCO a été défini comme étant le temps mis par le CCO marqué par le bleu de méthylène, entre la base de l'infundibulum et l'ostium. Les auteurs ont montré que la fumée de cigarette inhibait la captation du CCO par la trompe, indépendamment de la diminution de fréquence des battements ciliaires, qui peut être un facteur surajouté. Cette captation du CCO lorsque la trompe a été placée dans un environnement ventilé ou non par la fumée de cigarettes a été filmé par Talbot *et al (15)* voir Figure 1.

La fumée de cigarette présente donc plusieurs actions distinctes sur la trompe :

- retard à la captation de l'ovocyte et diminution de la fréquence des battements des cils tubaires allongeant le temps du transit tubaire ;
- altération de la contractilité tubaire allongeant aussi le temps de transit tubaire.

La figure 1 nous montre qu'il existe un retard à la captation de l'ovocyte marqué par coloration au bleu de méthylène lorsque la trompe est ventilée avec de la fumée de cigarette par rapport à la trompe ventilée par de l'air non « pollué ».



Movies showing movement of *Lycopodium* spores and OCCs on the surface of hamster infundibula. (A) *Lycopodium* spores being picked up by currents above hamster oviductal cilia. (B) Stained OCC traveling over the surface of a hamster infundibulum. (C) Bird's eye view of the ostium showing entry of a stained OCC. (D) Higher-magnification video showing movement of an OCC into the ostium. (E) Video showing pickup of an OCC that has been recovered from inside an infundibulum. The matrix of the OCC has been compacted and is no longer elastic. (F) Pair of movies showing the effect of cigarette smoke on OCC pickup. The infundibulum on the left has been exposed to sidestream smoke solution, whereas the one on the right was incubated in control medium only.

**Figure 1 : Captation du CCO marqué au bleu de méthylène par la trompe ventilée ou non par de la fumée de cigarettes (15).**

### **2.1.3.2 Impact ovarien :**

#### **2.1.3.2.1 Réserve ovarienne :**

Le tabagisme est également significativement associé à une déplétion de la **réserve ovarienne en follicules**. En effet, on constate chez les fumeuses, un avancement de l'âge de la ménopause (variant de 1 à 4 ans), corrélé au nombre de cigarettes fumées et à la durée du tabagisme (16).

Le statut ovarien peut également être évalué grâce au taux **basal de FSH**. Cooper *et al* (17) ont étudié 290 femmes, âgées de 38 à 49 ans. Le taux de FSH était 1,66 fois plus élevé chez les fumeuses actives (14,0 IU/L) et 1,39 fois plus élevé chez les fumeuses passives (11,7 IU/L) que chez les non fumeuses (8,4 IU/L).

L'altération de la réserve ovarienne peut être évaluée grâce au **test au citrate de clomiphène** (Clomid®). Dans une étude rétrospective, Sahara *et al* (18) ont comparé la réponse à ce test chez les patientes fumeuses actives (n =65) et chez les non fumeuses (n =145) recrutées dans une population générale infertile.

Les taux de FSH et d'estradiol ont été mesurés à J3 et à J10 du cycle avec administration du Clomid® de J5 à J9 du cycle. On considère qu'il existe une diminution de la réserve ovarienne lorsque le taux de FSH à J3 ou à J10 est supérieur à 10 IU/L. L'incidence de cette diminution est augmentée chez les fumeuses (8 sur 65 : 12,31%) comparée, après appariement par âge, aux non fumeuses (7 sur 145 : 4,83%). Cette différence est significative ( $p < 0.05$ , OR= 2.8, IC : 1.2 - 7.9). On peut donc conclure que les fumeuses présentent une accélération de la diminution de la réserve ovarienne, cliniquement et biologiquement détectable.

Cette diminution de la réponse ovarienne se reflète dans les résultats obtenus par les fumeuses lors des cycles d'AMP. De nombreux auteurs se sont attachés à comparer le nombre d'ovocytes recueillis au cours des FIV, en fonction de l'absence ou de la présence d'un tabagisme féminin.

Zenzes a regroupé ces différentes études (19) et a montré que le **nombre moyen d'ovocytes recueillis** au cours des FIV chez les fumeuses était de 8 à 17% inférieur à celui des non fumeuses en fonction de l'intensité du tabagisme. C'est ce que nous rapporte le tableau II.

Reference	Smoking status	No. of cigarettes/day	No. of women	Mean age (years)	Mean no. of oocytes	S/NS (oocytes) <sup>a</sup>
Harrison <i>et al.</i> (1990)	S	-	108	<40	5.0	0.980
		1-10	72		5.4	
		11-20	31		4.4	
		21-30	5		3.8	
	NS		542	<40	5.1	
Elenbogen <i>et al.</i> (1991)	S	-	20	33.5	6.2	0.912
	NS		21	32.6	6.8	
Pattinson <i>et al.</i> (1991)	S	-	?	33.1	5.1	0.944 <sup>b</sup>
	NS		?	32.6	5.4	
Van Voorhuis <i>et al.</i> (1992)	S	-	18	32.6	13.4*	0.817
	NS		36	32.3	16.4	
Hughes <i>et al.</i> (1992)	S	-	59	32.8	5.54 <sup>c</sup>	0.972
		1-14	36	31.8	5.95 <sup>c</sup>	
		≥15	23	34.4	4.90 <sup>c</sup>	
	NS		163	34.1	5.70 <sup>c</sup>	
Hughes <i>et al.</i> (1994)	S	-	96	33.5	6.57 <sup>c*</sup>	1.127
	NS		119	34.3	5.83 <sup>c</sup>	
Sharara <i>et al.</i> (1994)	S	-	29	37.8	8.4	0.977
	NS		73	37.2	8.6	
Zenzes <i>et al.</i> (1995)	S	-	33	32.3	7.67	0.765
		<15	19	32.2	7.95	
		≥15	14	32.4	7.29	
	PS		21	32.1	9.52 <sup>d</sup>	
	NS		102	33.8	10.02	
Van Voorhuis <i>et al.</i> (1996)	S	-	37	31.5	14.0 <sup>d</sup>	0.909
	XS	-	111	33.8	15.1 <sup>b</sup>	
	NS		351	32.9	15.4	
El-Nemr <i>et al.</i> (1998)	S	-	65	33.3	6.2	0.559
	NS		108	33.2	11.1	

S = smokers; NS = non-smokers; PS = husband smokes but not wife; XS = ex-smokers.

<sup>a</sup>Mean no. of oocytes from smokers divided by the mean for non-smokers. Calculated by present authors from means given by study authors. Weighting the individual study ratios by the numbers of smoker women or cycles, the overall weighted mean ratio for nine studies (omitting that of Pattinson *et al.*, 1991, which did not give number of women or cycles) is  $0.920 \pm 0.008$ , significantly different from one (no smoking effect) at  $P \leq 0.001$ . Using only heavier smokers (Harrison *et al.*, 1990, 11-30 cigarettes/day; Hughes *et al.*, 1992, Zenzes *et al.*, 1995), the weighted mean is  $0.828 \pm 0.006$ , significantly different from one at  $P \leq 0.001$ .

<sup>b</sup>Not used in the calculation of the overall S/NS ratio.

<sup>c</sup>Using no. of cycles.

<sup>d</sup>Dose-dependent correlation with pack-years of cigarette smoking (packs/day  $\times$  years of smoking).

\*Significant difference between smokers and non-smokers ( $P < 0.05$ ).

\*\*Significantly different ( $P \leq 0.0001$ ).

Tableau II : Etude du nombre d'ovocytes recueillis au cours des cycles de FIV en cas de tabagisme (19).

### 2.1.3.2.2 L'intoxication tabagique folliculaire :

De nombreux composants de la fumée de cigarette tels que la cotinine, les radicaux libres (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène), le benzopyrène peuvent influencer sur la folliculogénèse.

La **cotinine**, marqueur spécifique de la prise de nicotine, a été détectée dans le fluide folliculaire de fumeuses (20). Une forte corrélation entre le nombre de cigarettes fumées par jour et le niveau de cotinine dans le fluide folliculaire a été retrouvée ( $r = 0.75$  et  $p < 0,0001$ ), démontrant un effet dose. Cet effet dose suggère que la cotinine s'accumule dans les follicules en croissance chez les fumeuses régulières. D'ailleurs, la cotinine est incorporée dans les cellules du follicule (21, 22). On peut donc penser que la cotinine interagit directement avec les cellules de la granulosa et avec l'ovocyte en croissance.

Pawolski *et al* (23) a étudié l'impact du tabagisme sur la production de **radicaux libres**. En effet, la fumée de cigarette est une source majeure de pro-oxydants exogènes, responsables d'une peroxydation lipidique importante.

Cent huit patientes, prises en charge en FIV, dont le statut tabagique a été évalué par dosage de la cotinine dans le fluide folliculaire, ont été étudiées (fumeuses actives  $n = 15$ , fumeuses passives  $n = 21$  et non fumeuses  $n = 72$ ). Le milieu redox intra folliculaire a été évalué grâce à l'étude de la peroxydation lipidique, utilisant la méthode de réaction des thiobarbituriques. Cette méthode est basée sur le fait que les produits de la peroxydation réagissent avec l'acide thiobarbiturique, ce qui produit une réaction colorée rouge. L'exposition à la fumée de cigarette, validée par la présence de cotinine intra folliculaire, est associée de façon significative à une augmentation de l'intensité de la peroxydation lipidique ( $p < 0,001$ ), diminuant de façon significative le potentiel oxydant ( $p = 0,004$ ).

Ces résultats indiquent que le tabagisme actif affecte la balance oxydant / antioxydant à l'intérieur du follicule préovulatoire, induisant un stress oxydant intra folliculaire. Cela pourrait être une des explications possibles de la détérioration de la folliculogénèse chez les fumeuses.

D'autres composants de la fumée de cigarette peuvent influencer sur la folliculogénèse. Le **benzopyrène**, substance mutagène et cancérigène (24), dont la présence a été retrouvée dans les cellules de la granulosa des fumeuses (25), peut être à l'origine d'altération de l'ADN. En effet, il induit dans les lignées lymphocytaires dérivées de hamsters chinois des anomalies cytogénétiques de nombre et de structure (26).

### 2.1.3.2.3 L'ovocyte :

#### 2.1.3.2.3.1 Maturation nucléaire :

Zenzes *et al* (27) a étudié l'effet du tabagisme sur la **maturation méiotique des ovocytes** chez 156 femmes bénéficiant d'un programme de FIV. Ces patientes sont réparties en non fumeuses (NF, n = 102), fumeuses passives (FP, n = 21), fumeuses actives modérées (FAM, <15 cigarettes / jour ; n = 19) et fumeuses actives importantes (FAI, ≥15 cigarettes / jour ; n = 14). Une analyse cytogénétique a été réalisée sur 286 ovocytes, non vus fécondés. La proportion d'ovocytes en métaphase II (MII) haploïdes et aneuploïdes est similaire dans les différents groupes.

Par contre, chez les fumeuses actives et passives, on observe une augmentation de la proportion d'**ovocytes diploïdes** (p = 0.0003 avec NF=5,1%, FP= 13%, FAM= 12,1% et FAI= 21,2%). Ceci pourrait être lié à un défaut d'expulsion du premier globule polaire, par altération du fuseau méiotique ou du mécanisme d'activation de l'ovocyte.

Il existe aussi chez les fumeuses, une augmentation de la proportion des **zygotes triploïdes** (p = 0,03 avec NF= 4,1%, FP= 4,3%, FAM= 9,1% et FAI= 15,1%), qui pourrait résulter d'une non expulsion du second globule polaire. Les alcaloïdes étant connus pour se lier à la tubuline (28), on peut imaginer que l'intoxication tabagique peut entraîner des dysfonctionnements de la polymérisation et de l'assemblage du fuseau méiotique. Cependant, il semble difficile de conclure sur une seule étude et sur un nombre limité d'ovocytes d'autant que des perturbations de la mécanique fusoriale auraient dû également entraîner une inflation du taux d'aneuploïdie.

#### 2.1.3.2.3.2 La Zone Pellucide :

- Structure :

La zone pellucide (ZP), enveloppe péri-ovocytaire, poreuse, transparente, acellulaire, asymétrique, dont l'épaisseur moyenne dans l'espèce humaine est de 10 à 15µm, est synthétisée puis sécrétée par l'ovocyte au cours de l'ovogenèse. Son apparition est concomitante de l'initiation de la croissance ovocytaire. La ZP s'épaissit en même temps que l'ovocyte croît.

Elle est constituée chez la souris de 3 glycoprotéines mZP1, mZP2 et mZP3 (Wassarman *et al*, **29**), glycosylées de façon hétérogène au niveau des (N) asparagine et des (O) sérine-thréonine liées aux oligosaccharides, alors qu'elle en comporte 4 chez l'homme : hZP1, hZPA, hZPB et hZPC (**30,31**). Le degré d'homologie entre les glycoprotéines de souris et celles de l'homme sont de 67% entre hZP1 et mZP1, 57% entre hZPA et mZP2 et 63% entre hZPC et mZP3 (Petit, 2005, communication personnelle).

- Rôles de la ZP dans la fécondation :

Cette épaisse enveloppe externe de l'ovocyte porte les sites de liaison aux gamètes mâles, permettant une reconnaissance spécifique d'espèce du spermatozoïde. Ces liaisons entraînent l'induction de la réaction acrosomique (RA) et préparent la fusion du spermatozoïde et de l'ovocyte.

En effet, Wassarman *et al* (**32**) ont montré que, chez la souris, la liaison primaire du spermatozoïde à la ZP était due à la fixation du spermatozoïde par une enzyme membranaire, la galactosyltransférase à une chaîne N-oligosaccharidique de la ZP3 de l'ovocyte. Cette liaison pourrait être à l'origine de l'initiation de la RA (**33**). Une fois la RA effectuée, a lieu la liaison secondaire du spermatozoïde à la ZP qui fait intervenir ZP2. Cette seconde fixation conforte l'ancrage du spermatozoïde à la ZP lorsque la membrane acrosomique a disparu (**34,35**), permettant la conversion de la proacrosine inactive en acrosine active. Cette dernière permettra la rupture des pontages entre ZP1 et ZP2/ ZP3 facilitant le franchissement de la ZP par le spermatozoïde (**36**).

Par ailleurs, la ZP participe à la prévention de la polyspermie. Les enzymes, libérées par exocytose des granules corticaux, modifient la ZP et rendent sa partie interne impénétrable aux spermatozoïdes arrivés après le spermatozoïde fécondant.

Enfin, la ZP protège l'embryon pendant son transit tubaire avant l'éclosion embryonnaire.

- **ZP et éclosion naturelle :**

Au 6<sup>ème</sup> jour après la fécondation se produit la rupture de la ZP, permettant l'éclosion, puis l'implantation du blastocyste. La fragilisation puis la rupture de la ZP sont dues à l'action des enzymes protéolytiques (lysines embryonnaires et utérines responsables de l'amincissement de la ZP) et à l'expansion du blastocyste qui fait pression sur la ZP. Le blastocyste par poussées successives s'échappe par l'ouverture ainsi créée et se retrouve libre de s'implanter.

Au cours de cycles de FIV, Loret de Mola (37) a étudié cette phase d'amincissement de la ZP humaine qui commence dès le 2<sup>ème</sup> jour suivant l'insémination (J0) et se réduit de 2 µm par jour environ : épaisseur moyenne de la ZP à J1 : 18µm ; à J2 : 16µm puis à J3 : 14µm. Cet amincissement dépend de la qualité de l'embryon.

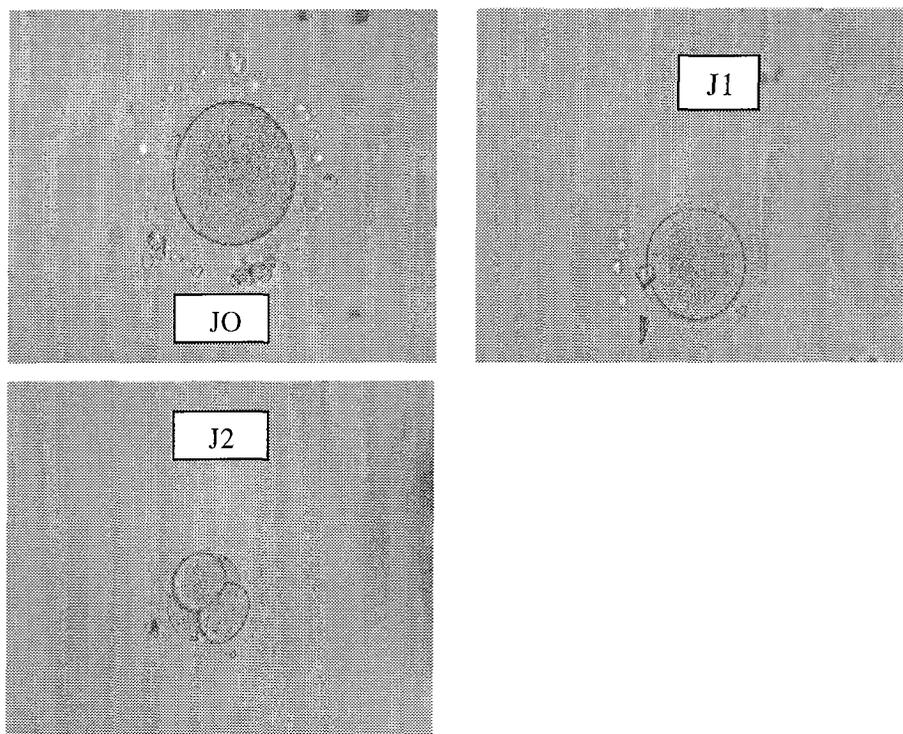


Figure 2 : Photos de zone pellucide d'ovocyte à J0 et à J1 et d'embryon à J2.

- **Etude de la ZP grâce au polscope :**

L'étude non invasive de l'architecture de la ZP des zygotes et des embryons humains a été possible grâce à l'utilisation du polscope, microscope numérique à lumière polarisée (38). Ce dernier, utilisé aussi pour étudier la dynamique du fuseau méiotique, a permis d'identifier 3 couches composant la ZP et a confirmé des données connues : la ZP des embryons âgés de 3 jours est plus fine ( $15,2 \pm 2,9 \mu\text{m}$  ;  $n = 83$ ) que celle des ovocytes matures ( $19,5 \pm 2,2 \mu\text{m}$  ;  $n = 92$ ) et que celles des ovocytes immatures ( $20,4 \pm 2,4 \mu\text{m}$  ;  $n = 33$ ).

La figure 3 nous montre des photos réalisées grâce au polscope d'ovocytes et d'embryons mettant en évidence les 3 couches de la ZP, dont l'épaisseur varie au cours de leurs évolutivités.

The multilaminar structure of the zona pellucida can be quantified with PolScope imaging. Human egg, imaged with differential interference contrast optics (A) and with the PolScope (B), (C) Cleavage-stage (day 3) embryo imaged with the PolScope. Distinct zona layers can be imaged with the PolScope. (D) Thickness and retardance of the zona and each of its layers were measured with spindle view in eight cohorts around the egg and embryo. (E) Contributions of individual zona layers to total zona thickness of eggs and cleavage stage embryos. Scale bars = 20  $\mu\text{m}$ .

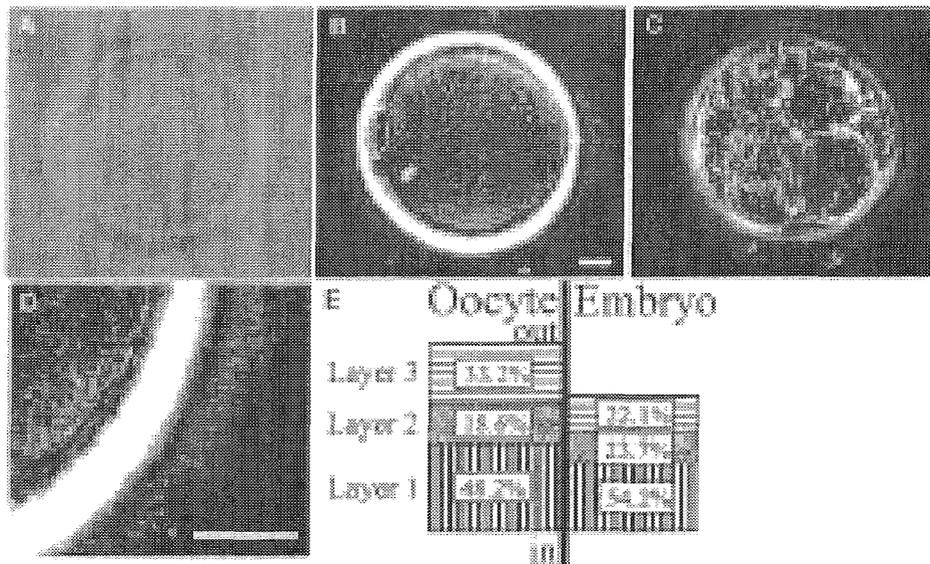


Figure 3: Photos par le polscope de la ZP d'ovocytes et d'embryons détaillant les 3 couches de cette dernière (38).

- **Variation des caractéristiques physicochimiques de la ZP et facteurs impliqués :**

Les caractéristiques physicochimiques de la ZP peuvent être étudiées grâce à différents paramètres : l'épaisseur moyenne de la ZP, le coefficient de variation de la ZP (ZPTV) ainsi que le temps de dissolution sous l'action de la pronase.

L'épaisseur moyenne de la ZP de 827 ovocytes provenant de 65 couples bénéficiant d'un cycle de FIV a été mesurée par Bertrand *et al* (39). Différents paramètres cliniques ont été analysés (âge des patientes, durée de la stimulation, maturité ovocytaire, nombre d'ovocytes obtenus, doses de gonadotrophines administrées et estradiolémie). Il existait une corrélation statistiquement significative pour seulement 2 paramètres : corrélation négative entre l'épaisseur moyenne de la ZP et l'estradiolémie ( $y = - 0,13x + 4,93$ ) et corrélation positive entre l'épaisseur moyenne de la ZP et la dose de gonadotrophines administrées ( $y = 2,65x - 9,06$ ).

Un autre paramètre, le coefficient de variabilité de l'épaisseur de la ZP (ZPTV) a été décrit. ZPTV est calculé selon la formule  $ZPTV = [(ZP_{max} - ZP_{moy}) / ZP_{moy}] \times 100$  d'après Cohen *et al* (40).

Ils ont montré que ce paramètre était corrélé au taux de grossesse des embryons humains transférés « frais ». En effet, aucune grossesse (0/21) n'était obtenue lorsque ZPTV de l'embryon transféré était inférieur à 10% (ZP dont l'épaisseur était uniforme) alors que le taux de grossesse était de 40% (24/60) lorsque ZPTV était supérieur à 25% (ZP dont l'épaisseur est fine ou irrégulière). Ces résultats sont retrouvés aussi bien pour les embryons transférés en frais ou après décongélation (41,42). En effet, lorsque ZPTV est élevée, cela signifie qu'il existe une portion de ZP moins épaisse susceptible de se rompre lors de l'évolution de l'embryon vers le stade blastocyste.

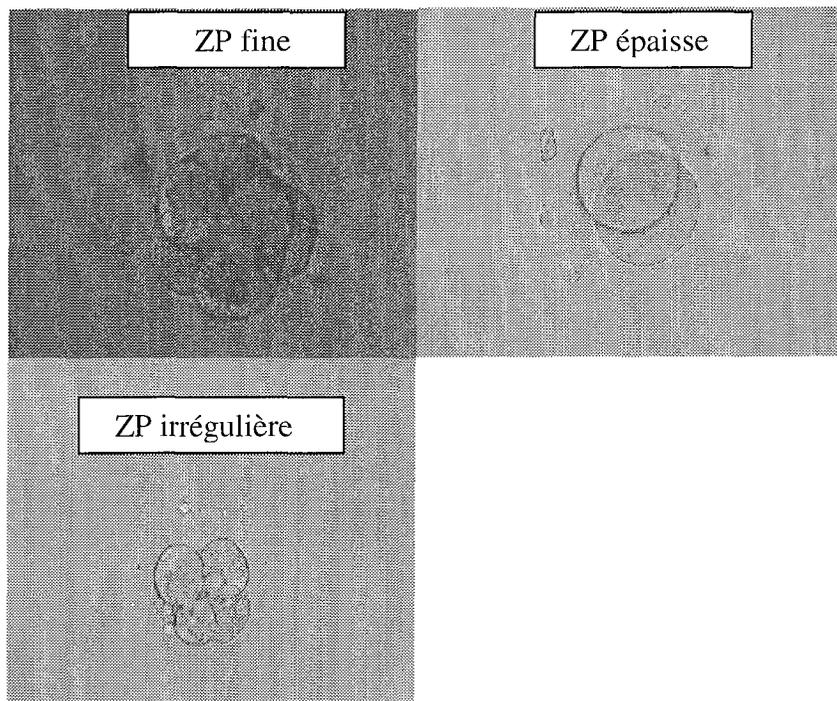


Figure 4 : Photos d'embryons ayant des zones pellucides différentes (fine, épaisse, irrégulière), prises au laboratoire de Biologie de la Reproduction (Dr Mandelbaum J, Tenon, Paris).

Les capacités de rupture de la ZP au moment de l'éclosion du blastocyste dépendent donc de son épaisseur et de son homogénéité, mais également de son degré de résistance aux enzymes protéolytiques. C'est pourquoi Loret de Mola a étudié le temps de dissolution de la ZP sous l'action de la pronase, enzyme protéolytique (37). Le temps moyen de dissolution de la ZP d'embryons est de 6 minutes. Cette action de la pronase a été utilisée pour faciliter l'éclosion de l'embryon dans certaines indications (cf paragraphe suivant).

- **Éclosion assistée et résultats :**

Le principal facteur limitant du succès de la FIV conventionnelle ou assistée (FIV ou ICSI) réside dans l'implantation des embryons transférés. En effet, d'après les résultats français (FIVNAT 1996), seuls 11% des embryons transférés vont s'implanter.

In vitro, seuls 20% des blastocystes sont capables d'éclore (42). Il suffit de réaliser une brèche artificielle dans la ZP (éclosion assistée) au 2<sup>ième</sup> ou au 3<sup>ième</sup> jour de vie embryonnaire pour que 100% des blastocystes éclosent en culture au 6<sup>ième</sup> ou au 7<sup>ième</sup> jour.

C'est pourquoi certains auteurs ont pensé que l'absence d'éclosion embryonnaire pouvait être une cause d'échec d'implantation et ont proposé de réaliser une assistance à l'éclosion avant de transférer les embryons dans l'utérus maternel.

De nombreuses études ont été rapportées dans la littérature avec des résultats discordants. Il semble que dans 2 indications, cette technique apporte un bénéfice significatif: lors des échecs répétés d'implantation d'embryons de bonne qualité et d'autre part, chez les patientes âgées de 38 ans et plus (43,44).

Figure 5 : hatching de la ZP d'un embryon avant son transfert,

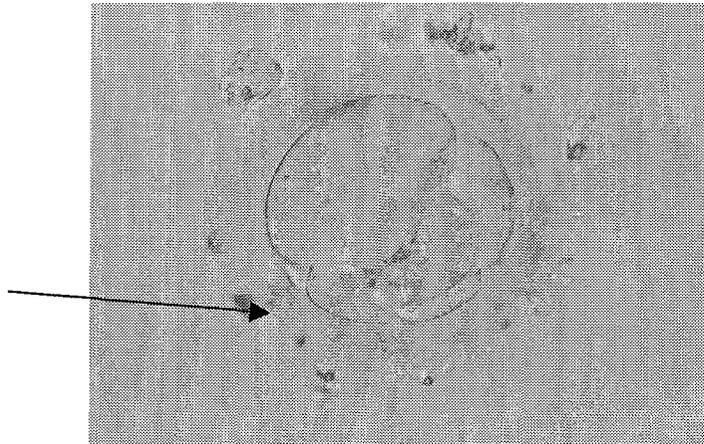


Photo du laboratoire de Biologie de la Reproduction, Dr Mandelbaum.J, Tenon, Paris.

- **ZP et imprégnation tabagique :**

Une récente étude (Shiloh *et al* (1)) a évalué l'impact du tabagisme actif et passif sur l'épaisseur de la ZP des ovocytes et des embryons humains. Cette étude prospective a inclus 169 patientes classées en fonction de leurs habitudes tabagiques (75 fumeuses actives (FA) fumant plus de 10 cigarettes par jour, 65 fumeuses passives (FP) dont le conjoint fume plus de 10 cigarettes par jour, et 29 non fumeuses (NF)). Seul l'interrogatoire a permis dans cette étude, d'évaluer le degré d'intoxication tabagique. La zone pellucide de 456 embryons a été mesurée. Shiloh a montré que l'épaisseur moyenne de la ZP des ovocytes, le jour de la ponction des patientes fumeuses actives et passives était significativement plus épaisse que celle observée chez les non fumeuses (20,15µm pour les FA, 20,62µm pour les FP et 15,32µm pour les NF). Il en est de même pour l'épaisseur moyenne de la ZP des embryons

âgés de 2 jours des patientes fumeuses passives et actives qui était significativement plus épaisse que celle observée chez les non fumeuses (19,33 $\mu$ m pour les **FA**, 20,53 $\mu$ m pour les **FP** et 15,09 $\mu$ m pour les **NF**).

Il existe donc un amincissement naturel de la ZP dans les 48 heures suivant la fécondation, non influencé par le tabagisme. Par contre, la ZP des embryons des femmes fumeuses est plus épaisse ce qui pourrait gêner la pénétration du spermatozoïde et les capacités d'éclosion de l'embryon.

### 2.1.3.3 Action sur l'implantation et le déroulement de la grossesse :

L'impact du tabagisme sur le risque de survenue de GEU a été détaillé dans le chapitre concernant l'impact tubaire.

La fréquence des avortements spontanés, définis comme l'expulsion d'un fœtus non viable (moins de 180 jours de vie intra-utérine) est augmentée en cas de tabagisme.

Ness *et al* (45) ont montré dans une étude de cohorte portant sur des femmes âgées de 14 à 40 ans se présentant aux urgences avec un diagnostic de grossesse, que le risque de faire un **avortement spontané** était de 1,8 (IC à 95% :1,3 - 2,6) chez des femmes ayant dans les urines de la cotinine présente et était de 1,4 (IC à 95% :1,0 - 2,1) chez des femmes n'ayant pas dans leurs cheveux de la cotinine présente.

Une étude rétrospective publiée en 2000 par Mishra *et al* (46) et réalisée sur 14 779 femmes âgées de 18 à 23 ans a montré une association entre **avortement spontané** et nombre de cigarettes fumées (OR= 1,7 avec IC à 95% : 1,2-2,5 pour les femmes fumant moins de 10 cigarettes par jour et OR= 2 avec IC à 95% : 1,5-2,8 pour les femmes fumant plus de 19 cigarettes par jour).

Les rapports de l'OMS sur les femmes et le tabac confirment l'association dose dépendante entre le tabagisme actif mais aussi passif et le **retard de croissance intra-utérin** (RCIU) et le faible poids de naissance. L'étude prospective et unicentrique de Gomez *et al* (47) réalisée en 2003 sur 856 parturientes, confirme largement cette association et démontre que de très faible taux de monoxyde de carbone, chez la mère et son partenaire, sont significativement ( $p=0,001$ ) associés à un faible poids de naissance avec un effet néfaste sur la croissance fœtale.

Le tabagisme favorise surtout les décollements marginaux des placentas normalement insérés.

La méta-analyse de Ananth *et al* (48), en 1999, à propos de 1 358 083 grossesses, a montré que l'incidence globale de l'**hématome rétro-placentaire** est égale à 0,64% ; chez les fumeuses, ce risque était doublé (OR :1,9 ;IC à 95% : 1,8- 2).

Enfin, le rôle du tabagisme dans la genèse de certains accouchements prématurés est maintenant bien établi : la méta-analyse de Shah et Bracken (49) montre un risque ajouté de **prématurité** (33-36 semaines d'aménorrhée) lié au tabac à 1,27 (IC à 95% : 1,21-1,33).

## 2.2 Comment évaluer l'imprégnation tabagique ?

De nombreuses études, comme nous venons de le décrire, semblent donc mettre l'accent sur l'impact négatif du tabagisme sur la fertilité féminine. C'est pourquoi, il est nécessaire d'évaluer précisément et objectivement cette imprégnation.

### 2.2.1 Les composants de la fumée de cigarette :

La fumée de cigarette comprend plus de 4 000 composants - tous n'ont pas encore été identifiés - parmi lesquels : le monoxyde de carbone (CO), des alcaloïdes dont la nicotine, des hydrocarbures poly-aromatiques, des métaux lourds dont le cadmium. Plus de 40 de ces substances sont connues comme étant des substances carcinogènes et mutagènes, susceptibles d'interférer avec la qualité des gamètes. Les composants principaux sont présentés par la figure 6.

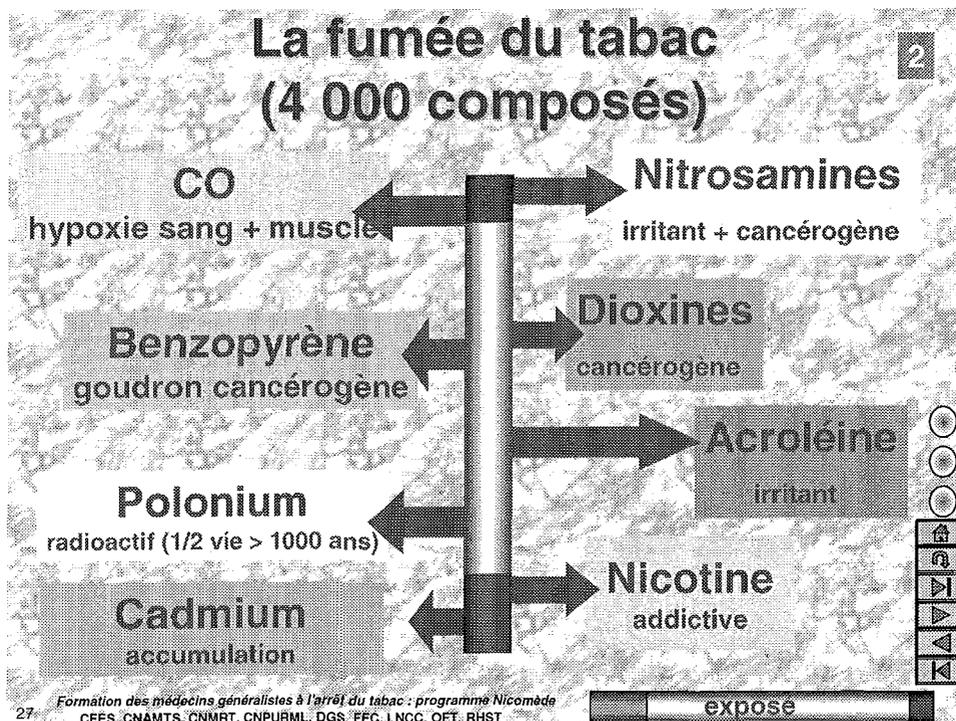


Figure 6 : Les composés de la fumée de cigarette.

La fumée de cigarette a été étudiée grâce à des « machines à fumer » qui permettent de séparer et de caractériser les phases gazeuses et particulaires qui la composent :

- *phase gazeuse* : gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) : 12-15%, monoxyde de carbone (CO) : 3-6%, cyanure d'hydrogène (HCN) : 0,1-0,2%, composés organiques volatiles (aldéhydes, cétones, ammoniaque...) : 1-3%.
- *phase particulaire* : le diamètre des particules est essentiellement compris entre 0,1 et 1µm, ce qui permet leur pénétration dans les alvéoles pulmonaires. Sur un plan clinique, les principaux toxiques sont :
  - les substances cancérigènes : hydrocarbures poly-aromatiques (benzopyrène...), dérivés nitrés hétérocycliques (pyridine...), aldéhydes, nitrosamines, cétones....
  - irritants : acroléines...
  - métaux lourds : cadmium, nickel...
  - radicaux libres : quinones, époxydes, composés peroxydés...
  - nicotine.

### **2.2.1.1 Le monoxyde de carbone (CO):**

Ce gaz létal présent dans la fumée de cigarette se lie à l'hémoglobine et est progressivement libéré au niveau des alvéoles, puis dans l'air alvéolaire expiré, comme le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Sa demi-vie est de l'ordre de 4 à 6 heures. Chez un non fumeur, le taux de CO dans l'air expiré est environ de 5 particules par million (ppm).

Le CO a une affinité pour l'hémoglobine supérieure à celle de l'oxygène et représente ainsi un facteur d'hypoxie. Le taux de carboxyhémoglobine (HbCO) d'un fumeur est en moyenne de 5 à 10% alors que celui d'un non-fumeur n'est que de 1 à 2%. Des taux élevés d'HbCO constituent un facteur de risque d'ischémie, en particulier coronarienne, et contribuent aux lésions endothéliales initiatrices d'artérite. Les taux sanguins d'HbCO varient au cours de la journée en fonction de l'activité physique, et surtout du temps écoulé depuis la dernière cigarette. Aussi, la mesure du taux de CO permet-elle de quantifier le tabagisme des dernières heures précédant l'examen.

### **2.2.1.2 Les substances carcinogènes :**

Elles sont essentiellement représentées par les goudrons, dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques, comme le 3,4 benzopyrène. Ces substances ne sont pas directement carcinogènes ; en effet, ces hydrocarbures procarcinogènes sont transformés, sous l'action de certaines enzymes de la famille des cytochromes P450, en métabolites intermédiaires qui peuvent former, en combinaison avec l'ADN, des adduits à l'origine de mutations. Lorsque les mécanismes de réparation de l'ADN sont dépassés, ces mutations pathologiques de l'ADN sont transmises aux cellules filles.

### **2.2.1.3 Les substances irritantes :**

Plusieurs composants sont sources d'agression :

- *Les irritants* (HCN, aldéhydes, acroléine) : ils agressent directement l'épithélium bronchique provoquant des lésions des cellules épithéliales bronchiques, de leurs cils, une hypersécrétion de mucus par altération fonctionnelle du tapis roulant mucociliaire et une diminution des mécanismes de défense des voies aériennes ;
- *Les enzymes protéolytiques* : la fumée de cigarette entraîne une activation des polynucléaires neutrophiles et des macrophages alvéolaires, avec libération de leurs enzymes (élastase...), ce qui modifie le rapport protéases / antiprotéases de façon péjorative, et conduit à une destruction progressive du parenchyme pulmonaire ;
- *Les radicaux libres oxydants* : présents dans la fumée de cigarette, sont libérés par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages et agressent directement les cellules bronchiques.

## **2.2.1.4 La nicotine :**

### **2.2.1.4.1 Apport en nicotine :**

La nicotine est l'alcaloïde prépondérant de tous les tabacs. Selon la marque et le type (légère ou pas), une cigarette contient entre 6 et 12 mg de nicotine. Sur la charge totale en nicotine de la cigarette, 1 mg en moyenne est absorbé par le fumeur. Ce chiffre est une moyenne de valeurs qui s'étagent entre 0,3 et 3mg (façon de fumer variable). A côté de la nicotine dont « bénéficie » directement le fumeur actif, les trois quarts du contenu en nicotine d'une cigarette fumée sont émis dans l'air ambiant et vont contribuer au tabagisme passif des sujets non-fumeurs. Dans une pièce où fumer est permis, la concentration en nicotine atteint 8 à 20  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  d'air, alors que dans une pièce où fumer est interdit, elle est de l'ordre de 0,3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (50).

### **2.2.1.4.2 Effets pharmacologiques de la nicotine :**

Les effets pharmacologiques de la nicotine sont nombreux, et cette liste n'est pas exhaustive... :

- Sur le système nerveux : libération de divers neurotransmetteurs (acétylcholine, noradrénaline, dopamine ...) ; les manifestations les plus fréquentes sont les réactions d'éveil ou à l'inverse de dépression, une stimulation de la vigilance et de la mémoire, un état anxiolytique voire euphorisant.
- Sur le système cardio-vasculaire : augmentation de la fréquence cardiaque, de la pression artérielle, du débit cardiaque, du flux sanguin coronaire, du débit sanguin cérébral. Le risque athérogène est aggravé par l'augmentation des LDL (Low Density Lipoprotein), des VLDL (Very Low Density Lipoprotein), la diminution des HDL (High Density Lipoprotein) et l'activation des plaquettes.
- Sur le système respiratoire : dépression du centre bulbaire, à fortes doses.
- Sur le système endocrinien : augmentation des taux de vasopressine, d'hormone de croissance, de cortisol, d'adrénocorticotropine (ACTH), et d'endorphines.
- Sur le système digestif : augmentation de l'activité motrice intestinale, nausées et vomissements à fortes doses.
- Sur le poids et le métabolisme basal : action anorexigène centrale (le poids des fumeurs est inférieur de 2 à 2,5 kg).

Enfin, la nicotine entraîne une dépendance physique et psychique, pouvant provoquer un syndrome de sevrage à l'arrêt de la consommation, avec des signes d'hyperactivité catécholaminergiques (anxiété, agitation, impatience, insomnie....)

#### **2.2.1.4.3 Absorption et distribution de la nicotine :**

Que le fumeur soit actif ou passif, le lieu de l'absorption est le poumon. Cette absorption est intense : 71% de la nicotine inhalée pénètre dans l'organisme, grâce à la large surface d'absorption de l'épithélium alvéolaire et à la lipophilie de la nicotine qui facilite son passage à travers la membrane des capillaires alvéolaires. Une fois franchie la paroi des capillaires alvéolaires, la nicotine véhiculée par le flux sanguin gagne très rapidement, en 7 secondes, le cerveau, et ceci sans subir la dégradation liée au phénomène de premier passage hépatique de règle lorsque l'absorption suit la voie digestive. La rapidité de transport jusqu'au cerveau de la nicotine non métabolisée peut être comparée à l'effet « shoot » obtenu par une injection intra-veineuse de drogue (51).

#### **2.2.1.4.4 Fixation aux récepteurs de la nicotine :**

Véhiculée par le flux sanguin, la nicotine va se fixer dans l'organisme sur les récepteurs cholinergiques de type nicotiques, situés au niveau du cerveau, mais aussi au niveau des ganglions du système nerveux autonome, de la glande médullo-surrénale, de la jonction neuromusculaire. Au niveau cérébral, et ce de façon assez similaire au mode d'action des drogues, la nicotine est capable d'augmenter la bio-disponibilité de la dopamine. La dopamine est le principal neurotransmetteur responsable de la sensation de bien être chez l'homme. La dépendance induite par l'usage de la nicotine découle directement de son activité sur le système dopaminergique (52).

#### 2.2.1.4.5 Métabolisme de la nicotine :

Transportée par le sang la nicotine parvient au foie, où elle subit une métabolisation intense qui donne naissance à de nombreuses molécules éliminées ensuite dans les urines. Pour une large part (80%), la nicotine est oxydée sur le cycle pyrol, en **cotinine**. La cotinine est éliminée libre (13%) ou glucuroconjugée (12,6%), hydroxylée en **trans-hydroxy-cotinine** éliminée libre (33,6%) ou glucuroconjugée (7,4%).

La fraction de nicotine qui échappe à l'oxydation en cotinine est éliminée libre (9,8%) ou glucuroconjugée (4,3%). Des dérivés déméthylés et N oxydés de nicotine et cotinine sont également formés. Au total, l'urine d'un fumeur contient plus de 10 métabolites différents de la nicotine. Pour un sujet donné, le profil urinaire des métabolites de la nicotine reste identique en pourcentage quelle que soit la voie d'absorption de la nicotine et la dose administrée. Mais, pour une même dose de nicotine ou une même voie d'absorption, il existe de grandes variations des pourcentages d'un sujet à l'autre. Deux réactions métaboliques sont à l'origine de cette variabilité inter individuelle : la réaction d'oxydation de la nicotine en cotinine et les réactions de glucuroconjugaison (53).

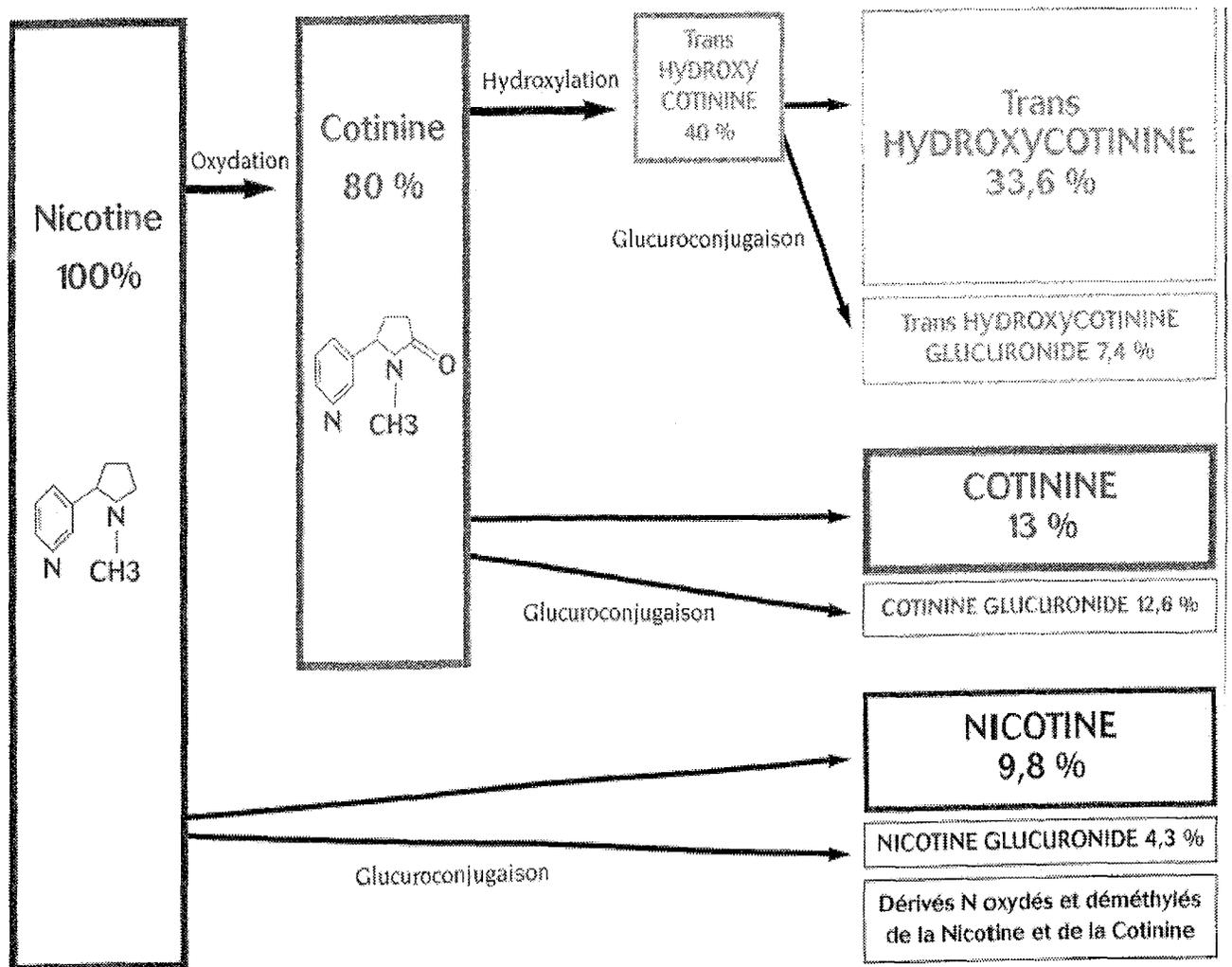


Figure 8 : Métabolisme de la nicotine.

#### 2.2.1.4.6 Pharmacocinétique de la nicotine :

La demi-vie, temps moyen mis par l'organisme pour éliminer 50% de la dose absorbée, a été mesurée de façon précise pour la nicotine et la cotinine à l'aide de produits marqués au deutérium (54).

Pour la nicotine, elle est comprise entre 120 et 160 minutes. Cette demi-vie brève explique que la concentration sanguine en nicotine fluctue en permanence chez un fumeur, tantôt augmentant, tantôt diminuant pendant la journée, s'annulant pendant la nuit. La cinétique de la nicotine a été représentée sur la figure 9.

## 2.2.1.5 La cotinine

### 2.2.1.5.1 Pharmacocinétique de la cotinine :

Comme nous venons de le décrire dans le chapitre concernant le métabolisme de la nicotine, la cotinine, principal métabolite de la nicotine, est un biomarqueur du tabagisme intéressant, puisque ayant une demi-vie d'élimination long (comprise entre 16 et 22 heures). En conséquence, la concentration sanguine de cotinine d'un fumeur se consolide et reste relativement stable au cours du nyctémère. En effet, pour des sujets fumant une vingtaine de cigarettes par jour, si à 8 heures du matin la concentration est plus basse (210 à 300 ng /ml), elle augmente de façon modérée et régulière jusqu'à minuit (240 à 400 ng /ml), puis elle fléchit jusqu'à 4 heures du matin (240 à 380 ng /ml) pour rejoindre ensuite la concentration initiale à 8 heures le matin suivant (50)

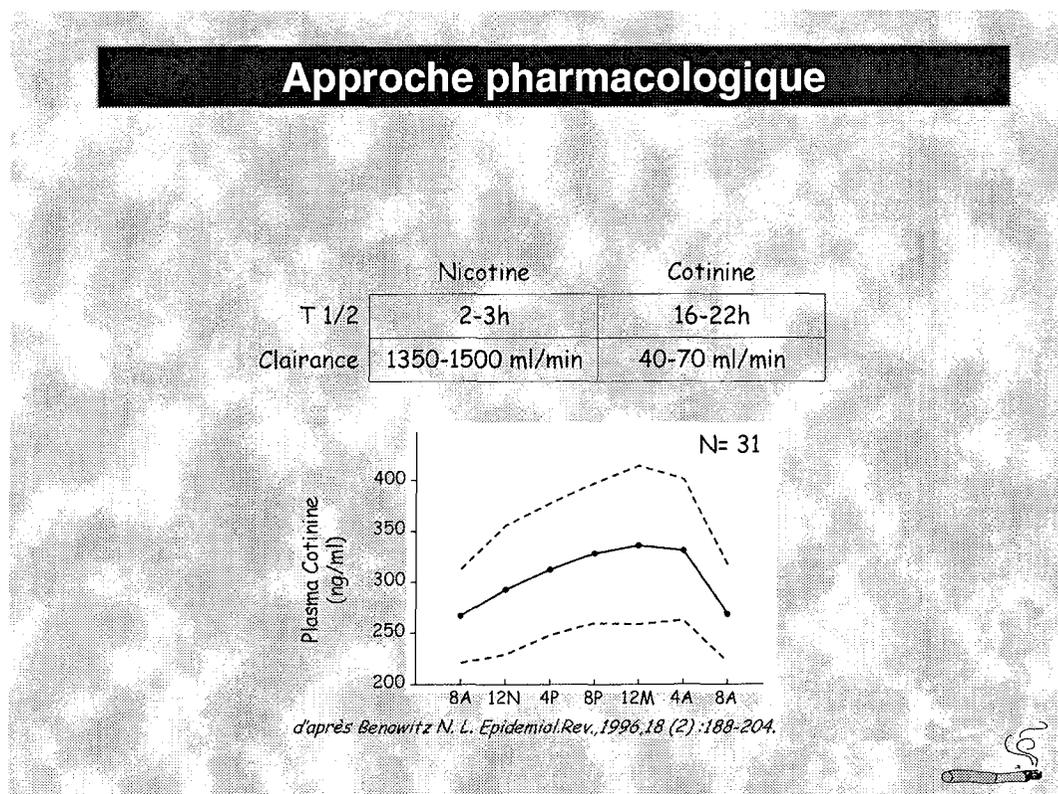


Figure 9: Pharmacocinétique de la nicotine et de la cotinine.

(d'après Benowitz et al, Epidemiol Rev, 1996, 18 : 188 – 204).

#### 2.2.1.5.2 Les milieux biologiques de dosage de la cotinine :

La cotinine a été retrouvée dans de nombreux liquides biologiques des fumeurs (sérum, urines, salive, lait maternel ...).

Nous allons décrire les différents milieux biologiques de dosage de la cotinine, car le choix du milieu biologique d'analyse, invasif ou non, peut procurer à ce biomarqueur, toute sa puissance d'investigation et sa pertinence.

##### 2.2.1.5.2.1 La cotinine plasmatique :

Le dosage de la cotinine dans le plasma semble lié au nombre de cigarettes fumées par jour (55).

Une formule a été proposée pour estimer à 20% près, à partir de la concentration sanguine en cotinine, l'apport quotidien en nicotine et le nombre de cigarettes fumées :

$$\begin{aligned} \text{Cotinine plasmatique } (\mu\text{g/L}) \times 0,8 &= \text{nicotine absorbée (mg/j)} \\ &= \text{nombre de cigarettes fumées par jour.} \end{aligned}$$

Par exemple, d'une concentration sanguine en cotinine mesurée à 300 $\mu\text{g/L}$ , on déduit que le sujet fume entre 20 et 30 cigarettes par jour.

##### 2.2.1.5.2.2 La cotinine urinaire :

Milieu aisé à recueillir, les urines sont le milieu de choix pour tester l'imprégnation tabagique car les concentrations retrouvées sont fortes, bien plus élevées que dans le sang et le recueil d'une miction suffit (56).

Le taux de cotinine urinaire varie en fonction du type de tabac. Une étude réalisée sur 130 volontaires et concernant le dosage de nicotine et de cotinine par HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance : cf chapitre concernant les techniques de dosage de la cotinine) a montré (57) des différences significatives de concentrations de nicotine et de cotinine, entre les fumeurs de tabac (cigarettes, hookas, bidis) et de distinguer les fumeurs actifs des fumeurs passifs et des non fumeurs.

De plus, la cotinurie est aussi utilisée lors du sevrage tabagique. En effet, l'évaluation de la concentration de cotinine urinaire avant arrêt du tabac va constituer une excellente référence pour mettre en place la substitution nicotinique. Les concentrations de cotinine obtenues une semaine après le début du traitement, lors de substitutions adaptées et efficaces, devront être au moins égales à 60% de celles observées avant traitement. Cette concentration de référence en cotinine avant arrêt est d'un intérêt capital, car il serait impensable de ne pas individualiser et prévoir l'intensité de la substitution en raison de la grande variabilité interindividuelle des concentrations plasmatiques en nicotine et cotinine chez le fumeur et chez le substitué en nicotine transdermique (58).

Par ailleurs, le tabagisme reste fréquent pendant la grossesse. Proposer une aide à l'arrêt du tabac dès le début de la grossesse permet de soustraire le fœtus à l'action toxique des composants de la fumée, en particulier du monoxyde de carbone. Le dosage de la cotinurie vient conforter le suivi du sevrage.

La cotinurie mérite donc une place de choix dans l'appréciation objective de l'imprégnation nicotinique et pour le suivi du sevrage, son évaluation permet l'adaptation personnalisée de la substitution nicotinique notamment après un événement clinique (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral...) ou chez la femme enceinte fumeuse.

#### 2.2.1.5.2.3 **La cotinine salivaire :**

Une étude réalisée sur 600 Chinois adultes et fumeurs et concernant le dosage de la cotinine salivaire (59), montre une bonne corrélation entre la concentration salivaire en cotinine et le nombre de cigarettes fumées en 24 heures. L'étude a montré également une grande variabilité de la concentration moyenne en cotinine salivaire, pour plus de 20 cigarettes journalières, plus élevée chez les sujets jeunes (métaboliseurs plus rapides), les fumeurs utilisant des cigarettes sans filtre (plus de nicotine), ceux inhalant fréquemment et profondément la fumée. L'hypothèse que les fumeurs pourraient réguler leur tabagisme de façon à obtenir leur optimum de nicotine est plausible.

## **2.2.2 La consommation de tabac :**

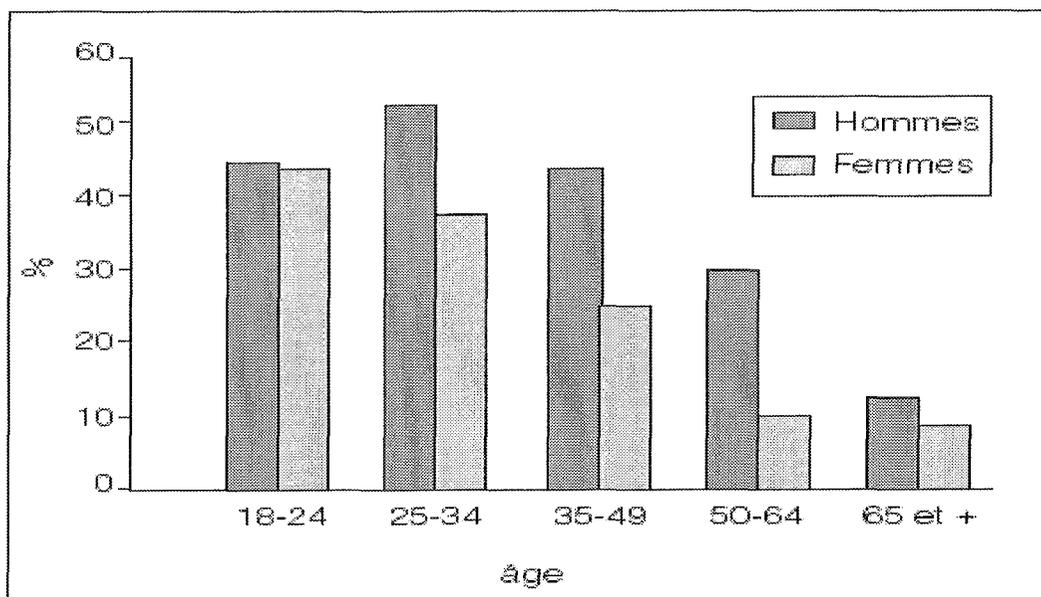
### **2.2.2.1 Epidémiologie :**

C'est depuis 1993 que les ventes de cigarettes ont amorcé une régression, et ce en raison de l'action des pouvoirs publics. En effet, avec la mise en place de la loi Evin en 1991, les pouvoirs publics se sont efforcés de diminuer la consommation de tabac et de protéger l'ensemble de la population contre le tabagisme passif. Les fortes augmentations du prix des cigarettes et du tabac depuis le début des années 90, décidées par les pouvoirs publics ont eu l'impact le plus fort sur la consommation.

En 1999, 28 à 35% des Français de plus de 15 ans se déclarent fumeurs. Le nombre moyen de cigarettes fumées quotidiennement est compris entre 13 et 19. Parmi les fumeurs, 45% consomment entre 1 et 10 cigarettes par jour, et environ 40%, entre 11 et 20. Seul 1% des fumeurs avouent une consommation supérieure à 2 paquets par jour.

Le tabagisme féminin est en décroissance puisqu'il est passé de 32% en 1984 à 25% en 2002. Cependant la prévalence du tabagisme chez les jeunes femmes de 18-24 ans est importante (46%) et quasiment identique à celui des jeunes hommes. Les femmes s'arrêtent plus tôt de fumer : dès la tranche de 25 – 34 ans (l'âge moyen de la première grossesse étant de 27 ans), le tabagisme féminine diminue mais reste tout de même élevé (40%) alors que le tabagisme masculin augmente (53%). On peut même dire que pendant toute la période de fertilité, le pourcentage de fumeuses ne descend pas au-dessous de 27%. C'est ce que nous montre la figure 10.

L'absence de diminution de la consommation chez les jeunes voire son augmentation génèrent de nombreuses craintes pour l'avenir : il est à redouter une apparition plus précoce de pathologies secondaires au tabagisme (67).



Source : Enquête CFES-IFOP, citée dans Prévention du tabagisme : éléments d'évaluation du plan de communication.

Figure 10 : Tabagisme en France selon l'âge et le sexe en 2002.

Si les risques du tabagisme passif (dû au tabagisme de l'environnement, cf paragraphe suivant) sont bien connus, la prévalence du tabagisme passif est encore peu étudiée. Une étude britannique (Javis *et al*), sous l'égide de l'OMS a corrélé le tabagisme passif des parents avec le taux de cotinine salivaire des enfants : de 1973 à 1994, la proportion de couples non-fumeurs a considérablement augmenté, passant de 31,3% à 56,8% ; la proportion de couples où un seul parent fume et où 2 parents fument a diminué plus modérément, respectivement de 38 à 30,6% et de 30,6 à 20,6 %. Le taux de cotinine salivaire des enfants est proportionnel à la quantité de cigarettes consommées par le couple parental, passant d'une moyenne de 0,3 mg/ L pour les enfants de parents non-fumeurs à 4 mg/ L pour une consommation parentale cumulée de 50 cigarettes par jour.

On peut extrapoler ces données à la femme enceinte soumise au tabagisme passif à la maison ou à son travail (67).

### **2.2.2.2 Définir le tabagisme (actif ou passif) :**

L'existence d'une relation dose-effet entre le tabagisme et ses conséquences pathologiques est formellement démontrée. Aussi, la quantification de celui-ci est-elle indispensable pour évaluer ses effets délétères chez les fumeurs.

Cette évaluation repose sur 2 étapes : l'interrogatoire du patient et la mesure de marqueurs du tabagisme.

#### **2.2.2.2.1 L'interrogatoire permet de différencier 2 types de tabagisme : l'un actif, l'autre passif.**

Concernant le tabagisme actif, on pourra estimer chez le patient fumeur, le nombre de cigarettes fumées par jour ainsi que la quantité totale de tabac fumé, estimée en *paquets-années* (par exemple : la consommation de 1 paquet de cigarettes par jour pendant 10 ans correspond à 10 paquets-années, celle de 2 paquets par jour, à 20 paquets-années, etc....).

Au cours de cet interrogatoire, on pourra aborder d'autres points :

- l'âge de début de la consommation
- la durée de l'intoxication
- les tentatives et réussite temporaires de sevrage : rares sont les fumeurs qui n'envisagent pas et / ou n'ont pas essayé, avec plus ou moins de succès, un sevrage tabagique.

Concernant le tabagisme passif, lié à l'inhalation involontaire par le patient non fumeur de la fumée de cigarette, il est plus difficile de quantifier ce type de tabagisme, qui peut être domestique (dû au tabagisme actif du conjoint) ou environnemental (dû au tabagisme professionnel ou publique). Les estimations, par évaluation indirecte, restent donc approximatives (60).

#### **2.2.2.2.2 Mesures de l'imprégnation tabagique**

Il existe plusieurs marqueurs du tabagisme permettant de mesurer de façon plus objective la consommation de tabac : mesure du taux de monoxyde de carbone, mesure de la nicotine et de la cotinine.

Le choix d'un biomarqueur repose sur sa mesure et la prise en considération de critères analytiques, de critères de praticabilité, de critères économiques (faible coût et durée brève d'analyse, facilité d'exécution et technique spécifique et sensible...).

##### **2.2.2.2.2.1 L'analyseur de monoxyde de carbone dans l'air expiré :**

On pourra évaluer de façon rapide et non invasive l'intoxication tabagique des patients grâce à des analyseurs de monoxyde de carbone (CO). Ces appareils permettent de mesurer le taux de CO dans l'air expiré, mais nécessitent une coopération du sujet. Ce dernier doit, après 15 secondes d'apnée souffler lentement dans l'embout buccal, en essayant de vider complètement ses poumons. La valeur ppm (particules par million de particules expirées) augmente et se bloque en atteignant le plus haut niveau. La mesure est alors indiquée par un voyant unique fixe.

Le résultat, en particules par million de particules expirées (ppm), est immédiat. Chez les non fumeurs, le taux de CO est inférieur à 6 ppm. Les mesures autour de 5 à 10 ppm sont plus significatives d'un tabagisme passif. Chez les fumeurs actifs, les taux de CO dépassent les 10 ppm et peuvent atteindre des valeurs bien plus élevées.

Les valeurs normales vont donc de 0 à 5 ppm, mais il faut tenir compte de la pollution atmosphérique (CO produit dans les gaz d'échappement des véhicules automobiles, par les rejets de l'industrie) qui peut être à l'origine de « faux positifs ».

Le taux de CO expiré augmente généralement avec la quantité de tabac consommée, mais il dépend également :

- du temps écoulé depuis la dernière cigarette : s'il dépasse 12 heures, les valeurs sont souvent « subnormales » voire normales ;
- du métabolisme de l'individu : certains éliminent plus rapidement que d'autres le CO.

L'expression immédiate de la mesure en ppm du monoxyde de carbone expiré par un analyseur de CO a le mérite de donner au fumeur un aperçu instantané et percutant de l'effet toxique de son attitude tabagique, ce qui peut parfois constituer un déclic déterminant à l'arrêt du tabac.

De plus, ce biomarqueur est intéressant pour apprécier l'abstinence au tabac chez les patients en cours de sevrage tabagique puisque le CO expiré devient inférieur à 10ppm après 24 heures d'arrêt. C'est un excellent outil lors de la consultation de sevrage :

- il motive fortement à l'arrêt du tabac lorsque la patiente constate les chiffres de CO élevés avant le début du sevrage.
- puis, lorsque le sevrage est en cours, il encourage les candidates à persister lorsqu'elles constatent la normalisation rapide de leur monoxyde d'azote. Les concentrations de CO obtenues sont, en effet, strictement normales dès le premier jour d'abstinence.

La mesure du taux de CO expiré est donc simple, rapide et peu coûteuse mais, d'une part ne permet pas une quantification fiable de l'imprégnation tabagique, indispensable pour évaluer ses effets délétères, et d'autre part le taux de CO se normalise au bout de quelques heures après l'arrêt de la consommation tabagique. C'est donc un marqueur à court terme, non spécifique du tabagisme, qui dépend de l'importance des bouffées et de l'heure de la dernière cigarette. C'est pourquoi, il est préférable de disposer d'un marqueur sensible et fiable de l'imprégnation tabagique.

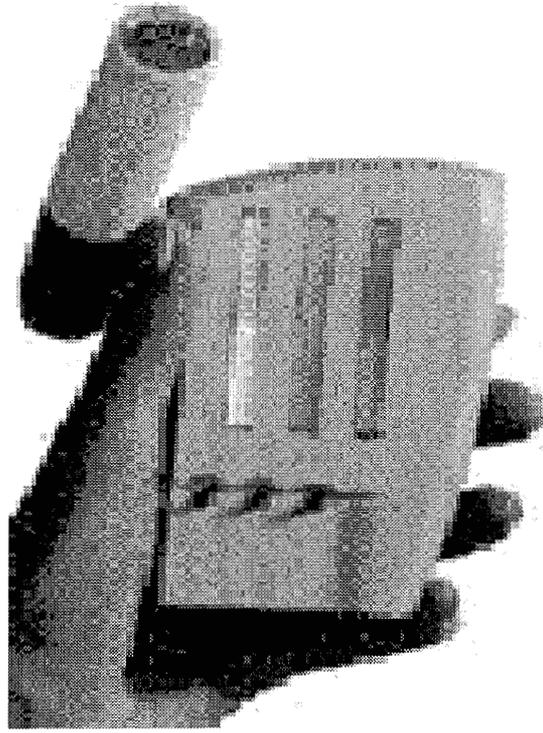


Figure 11: Analyseur de monoxyde de carbone (CO Testeur®).

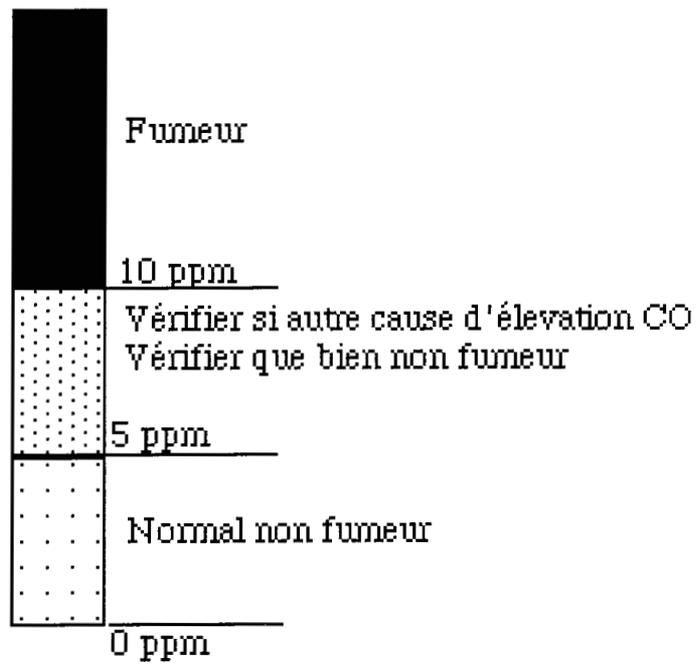


Figure 12 : Résultat de la mesure du taux de monoxyde de carbone (CO Testeur®).

#### 2.2.2.2.2 Le dosage des thiocyanates :

Le cyanure d'hydrogène et les cyanures organiques présents dans la fumée de cigarette sont absorbés au niveau du poumon, transformés au niveau hépatique en thiocyanates par une enzyme, la rhodanase, et éliminés dans les urines et la salive où ils sont le plus fréquemment dosés. Le taux d'acide cyanhydrique absorbé au niveau des poumons dépend beaucoup de la façon de fumer. Les cyanures liés à l'hémoglobine sous forme de cyanmethémoglobine sont physiologiquement métabolisés au niveau hépatique en thiocyanates.

Les concentrations de thiocyanates salivaires observées chez les fumeurs sont comprises entre 2,9 à 11,6 mg/L, voisines des concentrations sanguines (4,35 à 11,6 mg/L) et seraient plus spécifiques du tabagisme.

Mais il existe de nombreuses interférences, industrielles ou alimentaires qui rendent ce dosage peu intéressant et donc rarement prescrit (68).

#### 2.2.2.2.3 Les techniques de dosage de la nicotine et de ses métabolites :

La nicotine, principal alcaloïde du tabac est responsable de la dépendance pharmacologique. Elle ne peut être utilisée comme marqueur d'intoxication tabagique en raison de sa demi vie courte (de 2 à 3 heures). La nicotine est rapidement et intensément métabolisée en de nombreux métabolites dont le principal est la **cotinine**. La cotinine, est donc utilisée comme marqueur de l'exposition tabagique puisque sa  $\frac{1}{2}$  vie est de 16 à 20h. La cotinine et les autres métabolites de la nicotine peuvent être dosés par différentes techniques.

Nous allons détailler ces différentes méthodes de dosage :

- méthode séparative : chromatographie liquide à haute performance associée à un détecteur à ultraviolet
- méthode colorimétrique
- et méthode immunologique.

- **Méthode séparative : chromatographie liquide à haute performance (HPLC) associée à un détecteur à ultraviolet**

Un protocole de recommandations pour le dosage de la cotinurie (meilleur témoin de l'imprégnation tabagique) a été établi de manière consensuelle après comparaison des différents protocoles utilisés par les membres de l'étude (61). Les recommandations sont détaillées dans le tableau ci-dessous (figure 13).

La méthode préconisée est une chromatographie liquide en phase inverse avec appariement d'ions utilisant une colonne C18 à base de silice ultrapure sphérique ayant subi un traitement *end-capping*. L'étalon interne retenu est le 2-phénylimidazole. La cotinine étant une base faible possédant 2 pKa (pKa1= 6,16 ; pKa2 = 10,96), la rétention maximale sera obtenue pour un pH < pKa2. L'ajout de triéthylamine améliore la symétrie des pics et celui d'alkyls sulfonates comme contre-ion, la sélectivité. La chromatographie liquide est couplée à un détecteur à ultra-violet dont la lecture est effectuée à 260 nm.

**Solution étalon**

(-) Cotinine (Sigma)

Solution mère 1 mg/mL dans méthanol (conservation 12 mois – 20 °C)

**Gamme d'étalonnage**

– Tabagisme passif (0-200 µg/L)

– Tabagisme actif (150-2 500 µg/L)

(Dilution dans urine de non-fumeur préalablement testé ou NaCl 9 ‰)

**Étalon interne**

2 – Phénylimidazole (Aldrich)

Solution mère 1 mg/mL dans méthanol (conservation 12 mois – 20 °C)

**Colonne**

– Chromatographie en phase inverse de type C18 avec appariement d'ions (silice ultrapure sphérique end capping)

**Phase mobile**

– Tampon K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>/acide citrique zone de travail pH (3,5-5) suivant la nature de la colonne

– Méthanol ou/et acétonitrile phase organique de 5 à 20 % suivant la nature de la colonne

– Triéthylamine 0,5 % suivant la nature de la colonne

– Contre-ion : heptane ou octanesulfonate de sodium (< 1 mmol/L)

**Détection**

UV 260 nm

**Contrôles**

Promochem

**Extraction liquide-liquide**

– Tabagisme actif dichlorométhane en milieu alcalin

– Tabagisme passif extraction sur terre de diatomée (Extrelut, Chronolut...)

– élution par le dichlorométhane en milieu alcalin

– réextraction acide (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) de la phase organique

– réextraction de la phase aqueuse par le chloroforme en milieu alcalin

Figure 13: Recommandations pour le dosage de la cotinurie par chromatographie liquide couplée à la détection UV.

Si les conditions d'analyse sont identiques pour le tabagisme actif et passif, il n'en est pas de même pour les étapes d'extraction et les gammes d'étalonnage utilisées. Une seule étape d'extraction de type liquide-liquide (dichlorométhane en milieu basique) suffit dans le tabagisme actif pour une gamme de mesure de 0,15 à 2,5 mg/L.

En revanche, pour le tabagisme passif où de faibles concentrations sont recherchées, il est préférable de privilégier la pureté de l'extrait en réalisant une ré-extraction en milieu acide sous forme de sel.

La limite de détection a été déterminée à partir du signal mesuré pour 10 spécimens 0 et 10 spécimens d'une solution de cotinine à 10 µg/L. La limite de détection de la méthode est de 0,075 mg/L. L'imprécision, estimée par le coefficient de variation obtenu avec une solution de cotinine à 0,125 mg/L dosée 10 fois au cours d'une même série, est de 5%(56).

Cette méthode séparative bénéficie d'une limite de détection basse et se caractérise par une grande spécificité. C'est la technique de référence mais elle n'est pas automatisable. Elle permet de différencier les fumeurs actifs, des fumeurs passifs et des non fumeurs.

- **Méthode colorimétrique :**

La formation des dérivés colorés (métabolites de la nicotine) est obtenue par condensation avec l'acide barbiturique, suite à la rupture du cycle pyridine. Cette méthode est basée sur la réaction de König (KCN - chloramine T – acide barbiturique).

La lecture est effectuée à 510 nm. Une solution de cotinine est utilisée pour la gamme d'étalonnage qui varie de 0 à 35mg/L, d'où l'expression des résultats en « équivalent cotinine ».

Le seuil pour distinguer les fumeurs des non fumeurs est de 0,9 mg/L.

Cette technique n'est plus que rarement utilisée puisque cette méthode de dosage est non spécifique et peu sensible. Son intérêt provenait du fait qu'elle ne nécessitait pas d'appareillage spécifique et qu'elle avait un prix de revient modique. Sa limite de détection la rend inadaptée au tabagisme passif.

- **Méthode immunologique :**

Nous allons détailler les 2 types d'immunodosages : en phase homogène et en phase hétérogène. Ces méthodes offrent la possibilité d'une automatisation et une durée de dosage réduite. Ce sont des méthodes d'une grande praticabilité (69).

- **Immunodosage en phase homogène :**

Ce test repose sur la compétition entre la cotinine présente dans l'échantillon à doser et la cotinine marquée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase au niveau des sites de liaison d'un anticorps monoclonal de souris anticotinine. L'activité enzymatique décroît lorsque l'anticorps se lie, si bien que la concentration de cotinine de l'échantillon peut être mesurée en terme d'activité enzymatique.

La trousse Cotinine Enzyme Immunoassay® (Diagnostic Reagent Inc®), commercialisée en France par la société Micorgénics® peut être mis en œuvre sur l'analyseur Modular PP ou Cobbas (Roche Diagnostic®). Par ailleurs, la technique peut être adaptée sur les analyseurs « ouverts » de biochimie.

La révélation à 340 nm fait intervenir la réaction de réduction du NAD<sup>+</sup> en NADH, H<sup>+</sup>.

La courbe d'étalonnage se fait en 6 points (0 - 0,10 - 0,25 - 0,50 - 1,0 - 2,0 mg/L) à partir d'une urine négative surchargée de quantités croissantes de cotinine.

Les échantillons dont la concentration est trouvée supérieure à 2,0 mg/L sont réanalysés sur une dilution en eau physiologique.

Il existe 2 contrôles proposés : un contrôle bas (0,25 à 0,35 mg/L) et un contrôle haut (0,65 à 0,85 mg/L).

La limite de détection est de 0,05 mg/L et le domaine de mesure est compris entre 0,05 et 2,00 mg/L.

La durée du dosage est de 5 à 8 minutes selon l'automate utilisé.

Le dosage peut s'effectuer dans différents milieux : urines, plasma. Dans les urines, le cut off est à 0,50 mg/L.

○ **Immuno dosage des métabolites de la nicotine en phase hétérogène :**

Le principe est un dosage par compétition utilisant comme support solide une bille de polystyrène revêtue d'un anticorps poly clonal de lapin anti-cotinine. Après incubation de l'échantillon biologique en présence d'un traceur de cotinine marquée à la phosphatase alcaline, le traceur en excès est éliminé lors de l'étape de lavage par centrifugation axiale. Après ajout du substrat chimio-luminescent, se déroule une étape d'incubation pendant laquelle l'enzyme exerce son activité catalytique. Le signal est mesuré par un photomultiplicateur.

La méthode de dosage est rappelée sur le schéma de la figure 14 ci-dessous:

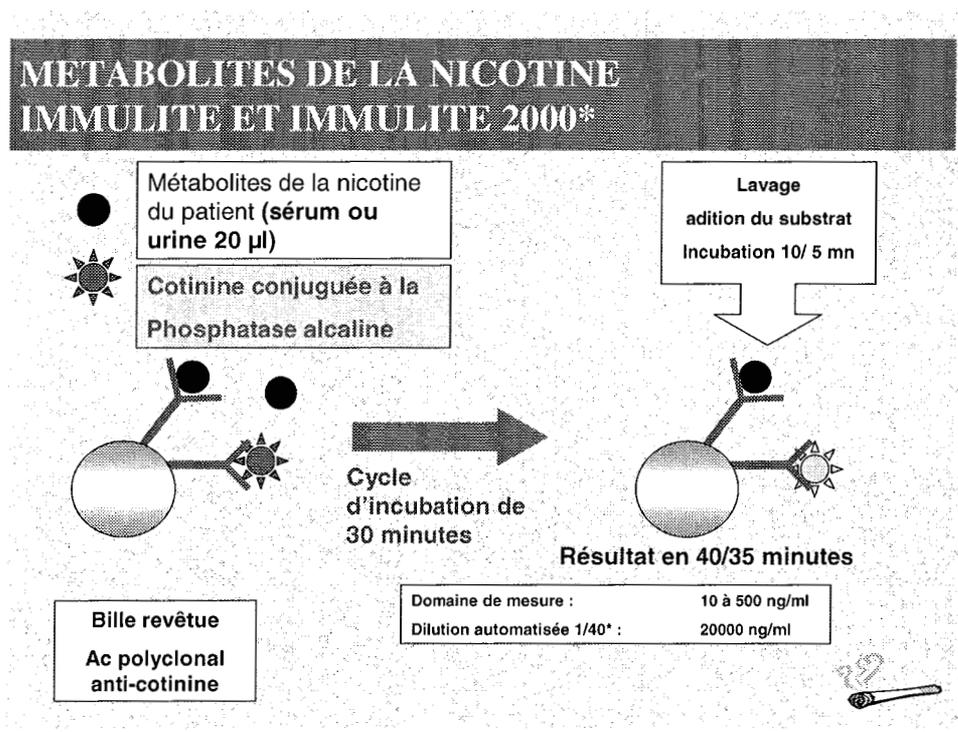


Figure 14 : Dosages des métabolites de la nicotine par immuno-analyse.  
(schéma du laboratoire DPC®)

La trousse Métabolite de la nicotine® (importée par DPC® France) est commercialisée pour des dosages sériques et urinaires sur les analyseurs Immulite et Immulite 2000.

Il existe 2 ajusteurs proposés : un ajusteur bas (environ 0,04 mg/L) et un ajusteur haut (environ 0,50 mg/L).

La limite de détection est de à 0,01 mg/L. Le domaine de mesure des métabolites de la cotinine est de 0,01 à 0,50mg/L.

La sensibilité analytique est de 0,005 mg/L.

La spécificité est très élevée : l'anticorps utilisé est hautement spécifique de la cotinine ; la réactivité croisée avec d'autres substances ou médicaments naturellement présents dans les échantillons des patients n'est pas détectables.

La présence de bilirubine, conjuguée ou non, n'a aucun effet sur le dosage ni sur la précision si la concentration ne dépasse pas 200 mg/L. La présence d'hémoglobine ne présente aucun effet sur les résultats ni sur la précision si la concentration ne dépasse pas 471 mg/dL. La présence de triglycérides jusqu'à une concentration de 3 000 mg/dL n'interfère ni sur la précision du dosage, ni sur les résultats.

La durée de dosage est de 35 à 40 minutes selon les automates.

Le dosage peut être effectué dans le sérum et le plasma. Dans le sérum, le cut off est de 0,025 mg/L, c'est-à-dire que lorsque la cotinine est inférieure à 0,025 mg/L, le patient est considéré comme non fumeur ; au dessus, il est considéré comme fumeur.

#### **2.2.2.2.4 Utilisation des techniques de dosages des métabolites de la nicotine :**

Nous allons faire le point sur les performances analytiques des diverses méthodes applicables au dosage des métabolites de la nicotine, au regard de leur intérêt pour la pratique clinique. En effet, il existe différentes techniques de dosages de la cotinine dont on adaptera l'utilisation au type de tabagisme que l'on voudra mettre en évidence.

- **Méthode séparative : chromatographie liquide à haute performance (HPLC) associée à un détecteur à ultraviolet (UV) :**

C'est la technique de référence puisqu'ayant une limite de détection à 7,5µg/L et une très grande spécificité.

- **Méthode colorimétrique :**

Le dosage par cette méthode a été réalisé sur 52 échantillons d'urines lors de l'étude de Jacob *et al* (56). La corrélation entre la colorimétrie et la HPLC-UV est médiocre, le coefficient r est égal à 0,46.

- **Méthode immunologique en phase homogène :**

L'imprécision importante constatée dans les concentrations inférieures à 0,2 mg/L avec la trousse Cotinine Enzyme Immunoassay® (Diagnostic Reagent Inc®) rend leur utilisation inappropriée pour le dépistage du tabagisme passif (62).

Deux études (62, 63) arrivent à la même conclusion : les concentrations de cotinine urinaire obtenues avec les trousses d'immunodosage en phase homogène sont plus élevées qu'en HPLC-UV. En effet, les anticorps réagissent de façon croisée mais partielle (50%) avec la 3-hydroxycotinine. Or, cette dernière correspond à 30% environ des métabolites urinaires de la nicotine, la cotinine n'en représentant que 15%. De plus, les concentrations de 3-hydroxycotinine et de cotinine peuvent varier dans un rapport allant de 2 à 7 selon les sujets. Ceci explique la corrélation relativement médiocre avec la HPLC-UV ( $r = 0,79$  pour  $p=0,0001$ ).

- **Méthode immunologique en phase hétérogène :**

Les techniques utilisant la trousse Métabolite de la nicotine® de chez DPC® ont par contre une bonne sensibilité, permettant le diagnostic du tabagisme passif grâce à son dosage urinaire (64).

Le schéma suivant résume donc l'utilisation appropriée de chaque technique pour les différents types de tabagisme :

- les méthodes chromatographiques permettent de détecter tous les types de tabagisme ;
- les méthodes immunologiques (en phase hétérogène) permettent de détecter le tabagisme passif et le tabagisme actif ;
- les méthodes colorimétriques ne peuvent détecter que le tabagisme actif lorsqu'il ne s'agit pas de « petits fumeurs ».

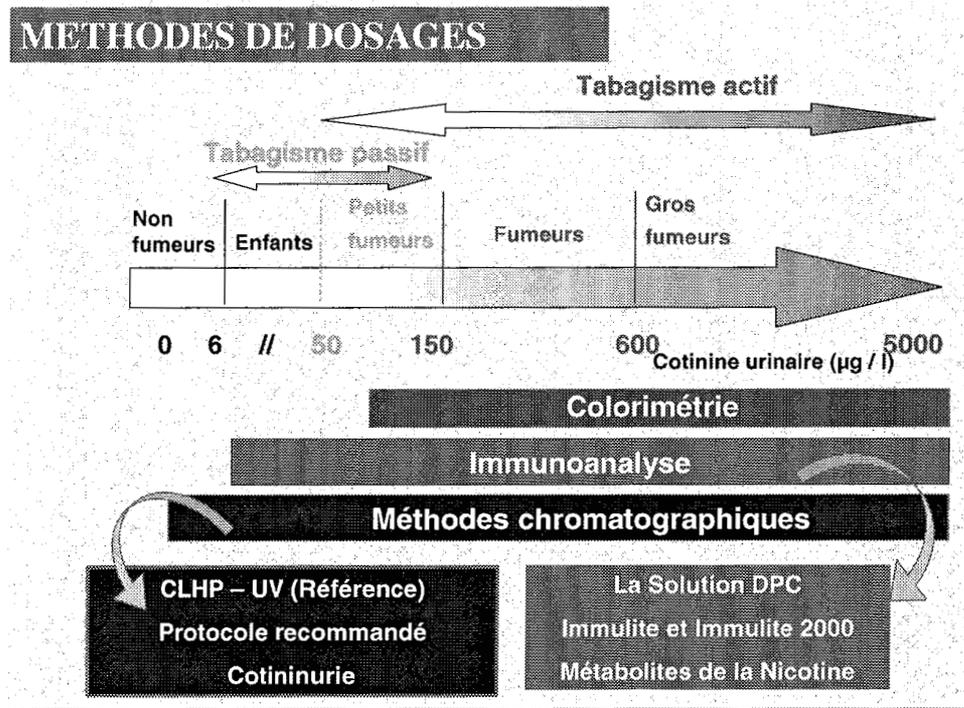


Figure 15 : Comparaison des différentes techniques de dosages de la cotinine. (schéma du laboratoire DPC®)

Une grande enquête dont on peut ainsi résumer les résultats a été menée aux Etats-Unis entre 1988 et 1991(57). Les fumeurs actifs ont, à de rares exceptions près, une concentration sanguine de cotinine supérieure à 10 µg/L et qui peut atteindre 1 000 µg/L. Les concentrations sont comprises entre 0,1 et 1µg/L pour les non fumeurs et entre 0,1 et 10µg/L pour les fumeurs passifs. C'est ce que nous résume la figure 16 ci-dessous.

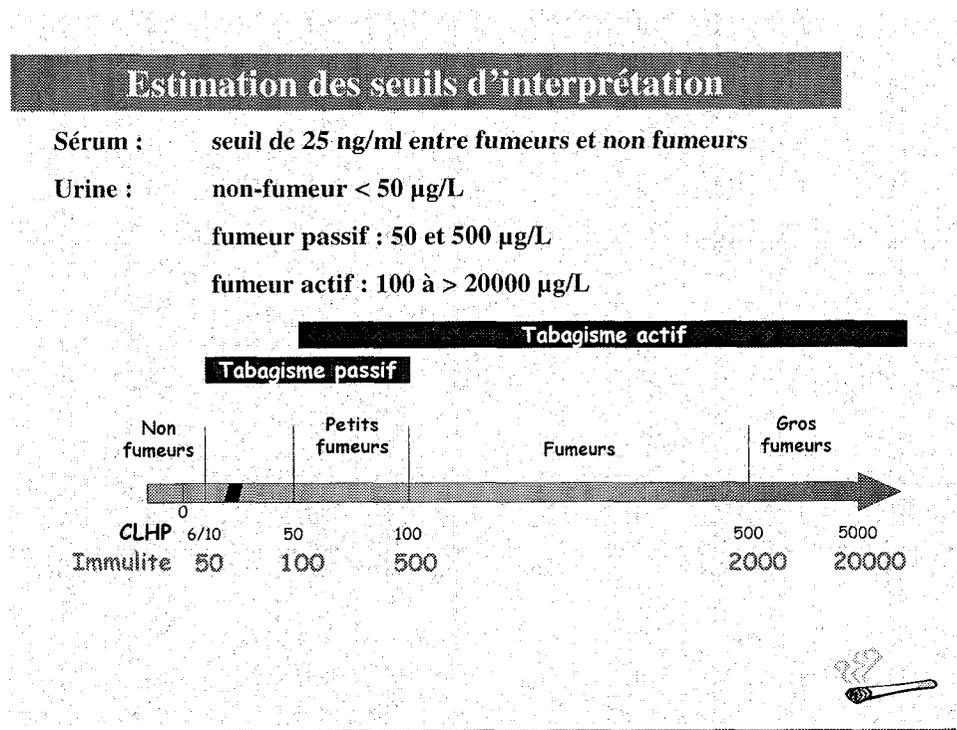


Figure 16: Estimation des seuils d'interprétation pour le dosage de la cotinine plasmatique (schéma du laboratoire DPC®)

### **3 MATRIELS ET METHODES :**

Le but de cette étude prospective est d'évaluer le retentissement du tabagisme, évalué par le dosage des métabolites de la cotinine dans le sérum et le fluide folliculaire, sur les caractéristiques physicochimiques de la ZP de l'ovocyte et de l'embryon et les capacités d'implantation des embryons issus de ces ovocytes.

#### **3.1 Patientes :**

Cette étude prospective a concerné 78 couples suivis pour des problèmes d'infertilité et ayant bénéficié d'une FIV à l'hôpital Tenon entre Janvier et Avril 2005.

Les conjointes ont été réparties, initialement d'après l'interrogatoire, en 3 groupes :

fumeuses actives (groupe A ; n= 23) , fumeuses passives (groupe B ; n= 16), non fumeuses (groupe C ; n= 39).

Les fumeuses passives sont différenciées en 2 sous groupes : tabagisme passif domestique (tabagisme du conjoint, n=13) ou environnemental (tabagisme dans le milieu professionnel, n=3)

Les patientes des 3 groupes ont été appariées selon l'âge, le type d'indication, la durée de stimulation, l'estradiolémie, le rang de la tentative et le type de réponse à la stimulation.

#### **3.2 Protocole de stimulation :**

Les 78 cycles de stimulation ont été réalisés selon un protocole long.

Le blocage de l'ovulation a été assuré soit par un agoniste du GnRH (Décapeptyl®, Ipsen Biotech) débuté en milieu de phase lutéale, soit par des antagonistes du GnRH (Orgalutran®, Organon, Cétrotide®, Sérono).

La stimulation ovarienne utilise des gonadotrophines exogènes recombinantes (Gonal F®, Serono ou Purégon®, Organon) ou des gonadotrophines urinaires ménopausiques d'origine humaine (Ménopur®, Ferring).

Le déclenchement de l'ovulation par 5 000 unités d' hCG recombinante (Ovitrelle®, Serono) est décidé sur les critères échographiques (> 3 follicules de 17 mm de diamètre) et biologiques (oestradiol plasmatique) (65).

Le sérum, prélevé au cours de ce protocole, sera conservé à -20°C en attente du dosage des métabolites de la cotinine, après centrifugation et décantation en 2 aliquotes de 2 ml.

### **3.3 Ponction ovocytaire :**

La ponction folliculaire est réalisée 36 à 38 heures après le déclenchement de l'ovulation. L'examen des liquides de ponctions folliculaires à la recherche des ovocytes est effectué à l'aide d'une loupe binoculaire munie d'une platine chauffante maintenue à 37°C.

Les CCO recueillis sont ensuite placés à l'étuve à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans l'air, dans un milieu de culture approprié (IVF Medium®, Medicult en FIV, ISM1®, Medicult en ICSI).

On récupérera l'ensemble des liquides folliculaires d'une même cohorte dont on prélèvera un échantillon. Les seringues contenant un fluide hémorragique ne seront pas gardées pour éviter toute contamination du dosage de la cotinine par la cotinine sérique. Les échantillons après centrifugation en aliquote de 2 ml seront conservés à -20° en attente du dosage.

### **3.4 Préparation du sperme :**

Le sperme est préparé par gradient de densité sur colonne de Puresperm® (45-90%). Après centrifugation de 20 minutes à 1500 tours/min (centrifugeuse Jouan), puis lavage de la fraction 90% par 6mL de Ferticult®, le culot est repris dans 0,1 à 0,5 mL de milieu en fonction de la richesse du sperme et de la technique d'AMP utilisée : IVF® pour FIV conventionnelle, ISM1® pour ICSI.

### **3.5 ICSI :**

Les ovocytes sont débarrassés des cellules du cumulus et de la corona par une exposition de 30 secondes à 40 UI/mL de hyaluronidase® (SynVITRO Hyadase, Medicult) suivie d'une décoronisation mécanique par pipetage dans des capillaires de 135 à 150µm de diamètre à l'aide d'un stripper (Micro X-CEL, Mid-Atlantic Diagnostics Inc).

Les ovocytes en MII sont micro-injectés à l'aide de micropipettes Humagen sur la platine chauffante d'un microscope inversé (Olympus IMT2) équipé d'un micro-manipulateur (Narishige.SBP). Chaque ovocyte à micro-injecter est placé dans une microgoutte de milieu ISM1 sous huile où il est maintenu par une micro-pipette de maintien reliée à une seringue permettant une aspiration contrôlée.

Le spermatozoïde ralenti dans une solution à 10% de PVP®, est cisailé mécaniquement au 1/3 moyen du flagelle puis injecté au centre de l'ovocyte. Les ovocytes

micro-injectés sont alors placés individuellement dans des boîtes à 4 puits à l'étuve à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans l'air, chaque puits contenant une micro-goutte de 10µL d'ISM1® sous huile.

### **3.6 FIV :**

Les complexes cumulo-ovocytaires (CCO) recueillis à la ponction sont tout d'abord incubés 3 heures dans le milieu IVF Medium®, tandis que les boîtes d'insémination contenant 80 000 à 100 000 spermatozoïdes dans le milieu IVF Medium® dans le puits n°1 sont préparées et placées à l'étuve. L'insémination est alors réalisée : les CCO (par groupe de 4) sont placés dans le puits n°1.

Le dénudage des ovocytes est réalisé mécaniquement 18 heures plus tard à l'aide d'un stripper et de capillaires de 150µm de diamètre. Après contrôle de la présence de 2 pronuclei, ils sont incubés séparément dans les microgouttes de 10µL d'IVF Medium® sous huile, afin d'assurer un suivi exact de chaque zygote.

### **3.7 Observation des zygotes :**

Les ovocytes sont observés 18 heures après la micro-injection ou 20 heures après l'insémination. Chaque zygote obtenu est alors décrit selon plusieurs critères (nombre, taille, position des pronuclei et, présence ou non d'un halo cytoplasmique).

### **3.8 Suivi des embryons :**

Durant les jours suivants (J2 et J3), la qualité des embryons est évaluée en tenant compte de paramètres morphologiques et cinétiques suivant la classification définie par les BLEFCO (nombre de blastomères, clivage typique ou atypique, pourcentage de fragments).

### **3.9 Mesure des caractéristiques physicochimiques de la ZP :**

#### **3.9.1 Epaisseur de la ZP :**

L'épaisseur de la ZP des embryons transférés (à J2 ou à J3) est mesurée aux 4 pôles de l'embryon à l'aide d'une grille adaptée sur l'écran d'un moniteur relié au microscope inversé. La moyenne des 4 déterminations est calculée ainsi que le coefficient de variabilité (ZPTV)

$(ZPTV = [(ZP_{max} - ZP_{moy}) / ZP_{moy}] \times 100)$ .

La ZP a été considérée comme épaisse lorsqu'elle était supérieure à 15µm.

#### **3.9.2 Résistance de la ZP :**

Le temps de dissolution de la ZP des ovocytes non fécondés, en MII, exposés à la pronase (2,5µg/ml, Protease P8811, Sigma dilué avec l'IVF Medium®) a été mesuré en minutes. L'observation a été effectuée à température ambiante sous la loupe binoculaire.

### **3.10 Transfert et mesure du taux de CO:**

Soixante dix huit transferts ont été réalisés à J2 ou à J3 post insémination ou micro-injection selon l'estradiolémie de la patiente le jour de la ponction : J2 si  $\leq 2500$  pg/mL, J3 si  $> 2500$  pg/mL.

Avant chaque transfert, l'imprégnation tabagique a été évaluée par l'interrogatoire puis confirmée par la mesure du taux de CO dans l'air expiré grâce au CO-Tester®, après accord de la patiente (chaque couple ayant signé après explications, un consentement éclairé concernant ce protocole de recherche) . La mesure consiste en une longue expiration continue dans un embout à usage unique relié à l'appareil de mesure. Les résultats sont exprimés en particules de CO expiré par millions de particules expirées (ppm).

### **3.11 Dosage des métabolites de la cotinine dans le sérum et le fluide folliculaire :**

Après décongélation à température ambiante, les aliquots de sérum et de fluide folliculaire sont homogénéisés et centrifugés. Les surnageants sont placés dans des tubes à codes barres afin que l'automate Immunlite 2000 (DPC®) effectue par immuno-analyse les dosages des métabolites de la cotinine dans ces différents liquides.

Les composants d'une trousse de 500 tests Référence LK NM 5 ont été mis en place dans l'automate Immunlite 2000 (DPC®) : une cartouche de 500 billes revêtues d'un anticorps polyclonal de lapin anti-cotinine ainsi qu'une cartouche de 11,5 ml de cotinine conjuguée à de la phosphatase alcaline (intestins de veaux) dans un tampon, avec conservateur.

Afin de procéder à un ajustement, 2 flacons contenant les ajusteurs « métabolites de la nicotine » (« bas » et « haut »), de 2 ml chacun, contenant de la cotinine dans du sérum humain prétraité, avec conservateur ont été également mis en place dans l'automate. Le contrôle « bas » était mesuré à 2 reprises; les valeurs obtenues étaient : 12,8 et 14,6 mg/L pour un intervalle compris entre 8,7 et 16,3 mg/L. Le contrôle « haut » était également mesuré à 2 reprises; les valeurs obtenues étaient : 45,1 et 48,5 mg/L pour un intervalle compris entre 31,0 et 55,0 mg/L.

### **3.12 Statistiques :**

Les résultats sont exprimés en moyenne +/- écart-type ou en pourcentage.

Les différences des moyennes sont comparées grâce au test t de Student. Ce test est le mieux adapté à notre population qui est composée d'un faible effectif et dont les sujets ont été appariés. Nous avons supposé que la distribution de nos différents paramètres était gaussienne.

Les taux de grossesse sont comparés grâce à un test de chi-deux, les valeurs de  $p < 0,05$  étant considérées comme statistiquement significatives.

Toutes les informations ont été notées sur une feuille d'observation puis enregistrées sur une base de données (Microsoft Excel).

### **3.13 Décision d'éclosion assistée :**

Tous les embryons ayant bénéficié, pour des indications précises (échecs répétés d'implantation, âge avancé de la patiente) d'un hatching, seront exclus de cette étude pour ne pas biaiser les résultats.

### **3.14 Appariement des populations :**

Les 2 groupes ont été appariés en fonction de l'âge, du type de stérilité, du rang de la tentative, du type et de la durée de la stimulation, de la technique de FIV, du nombre d'ovocytes recueillis et du nombre d'embryons transférés, du type de fécondation afin de n'avoir comme seul paramètre différenciant que le tabagisme.

### **3.15 Résultats des FIV :**

Une grossesse clinique est une grossesse ayant donné lieu à une sécrétion d'hCG > 1000 UI/mL ou à l'observation échographique d'un ou plusieurs sacs gestationnels.

Le taux de grossesses cliniques est calculé en divisant le nombre de grossesses cliniques par le nombre de transferts.

Le taux d'implantation est défini comme le nombre de sacs gestationnels observés à l'échographie divisé par le nombre d'embryons transférés.

## **4 RESULTATS :**

### **4.1 Population fumeuses actives :**

#### **4.1.1 caractéristiques des populations étudiées :**

Le groupe des patientes fumeuses actives (n= 23) a été comparé au groupe des patientes non fumeuses et ne présentent aucune différence significative concernant les paramètres suivants : âge, type de stérilité, type et durée de stimulation, technique de FIV, nombre d'ovocytes recueillis et nombre d'embryons transférés, puisque ces populations ont été appariées.

Les causes de l'infertilité sont masculines (52 vs 52%), féminines (26 vs 30%), mixtes (9 vs 3%) et idiopathiques (13 vs 4 %) respectivement pour les fumeuses actives et les non fumeuses.

Pour les 46 ponctions, 466 ovocytes ont été recueillis, parmi lesquels 284 (62 %) étaient matures (métaphase II).

Dans chaque groupe, 41 embryons transférés et 10 ovocytes non fécondés en métaphase II ont été étudiés.

Les caractéristiques des populations sont présentées dans le tableau III.

	<b><u>FUMEUSES ACTIVES</u></b>	<b><u>NON FUMEUSES</u></b>
Nombre patientes	23	23
Age patientes (année)	33,43 +/- 4,42	33,95 +/- 4,74
Durée stimulation (J)	11,39 +/- 2,80	11,13 +/- 1,39
Oestradiolémie (pg/mL)	2486 +/- 926	2506 +/- 811
Doses gonadotrophines (UI)	2404 +/- 1024	2130 +/- 728
Nombre ovocytes recueillis	215	251
Nombre MII	129	155
Nombre Embr. Transférés	41	41
Nombre MII étudiés	10	10

Tableau III : Caractéristiques des 2 populations.

#### 4.1.2 Imprégnation tabagique :

Cette imprégnation a été évaluée grâce à l'interrogatoire (nombre de cigarettes fumées par jour et durée du tabagisme), au taux de CO expiré et aux taux des métabolites de la cotinine dans le sérum et le fluide folliculaire :

	<u>FUMEUSES ACTIVES</u>	<u>NON FUMEUSES</u>
Nbre cigarettes /jour	6,9 +/- 4,22	0
Nbre paquets /année	10,69 +/- 6,89	0
Taux de CO expiré (ppm)	8,52 +/- 6,00	2,95 +/- 1,10
Taux métabolites cotinine sérique (ng/ml)	216,6 +/- 132,9	< 10
Taux métabolites cotinine fluide folliculaire (ng/ml)	166,0 +/- 117,1	< 10

Tableau IV : Evaluation imprégnation tabagique.

Il existe une bonne corrélation entre le taux des métabolites de la cotinine dans le sérum et le fluide folliculaire (figure 17). Ce dosage est un bon marqueur de l'imprégnation tabagique puisque toutes les patientes fumeuses actives ont eu des taux de métabolites de la cotinine détectables (>10 ng/ml), à la différence des non fumeuses.

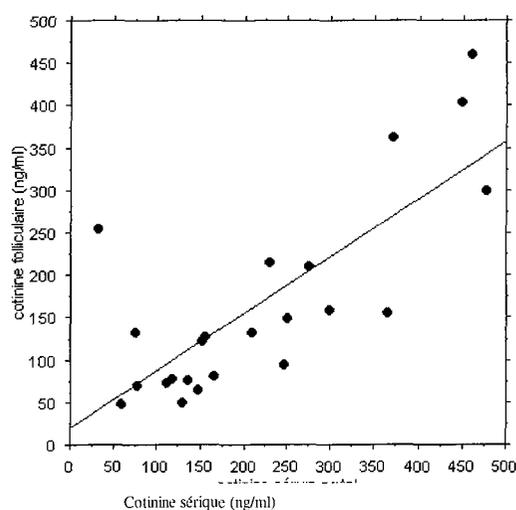


Figure 17: Métabolites de la cotinine sérique / folliculaire (ng/ ml).

### 4.1.3 Caractéristiques physicochimiques de la ZP :

On a donc pu comparer les caractéristiques physicochimiques de la ZP entre les 2 populations.

L'épaisseur moyenne de la ZP des embryons transférés, le coefficient de variabilité de la ZP des embryons transférés, le temps de dissolution des ovocytes en métaphase II non vus fécondés ainsi que l'épaisseur moyenne de la ZP des autres embryons de la cohorte ont été étudiés (cf tableau V).

<b>ZONE PELLUCIDE</b>	<b><u>FUMEUSES ACTIVES</u></b>	<b><u>NON FUMEUSES</u></b>
Epaisseur moyenne * (µm) embryons transférés	15,39 +/- 2,33	15,04 +/- 2,47
Coeff. de variabilité ZPTV (%) Embryons transférés	11,03 +/- 5,36	10,6 +/- 6,0
Temps dissolution pronase** (mn)	5,95 +/- 1,55	6,05 +/- 1,39
Epaisseur moyenne autres (µm) embryons de la cohorte ***	14,83 +/- 2,35	15,61 +/- 2,45

\* L'épaisseur moyenne a été calculée sur les embryons avant leur transfert (µm).

\*\* Le temps de dissolution sous l'action de la pronase (2,5 µg/mL) a été mesuré en minutes.

\*\*\* L'épaisseur moyenne a été calculée sur les embryons le jour de leur transfert (µm).

Tableau V : Caractéristiques physicochimiques de la ZP des ovocytes et des embryons.

La comparaison des caractéristiques physicochimiques de la ZP entre les 2 groupes de patientes n'a pas retrouvé de différence significative (figure 10).

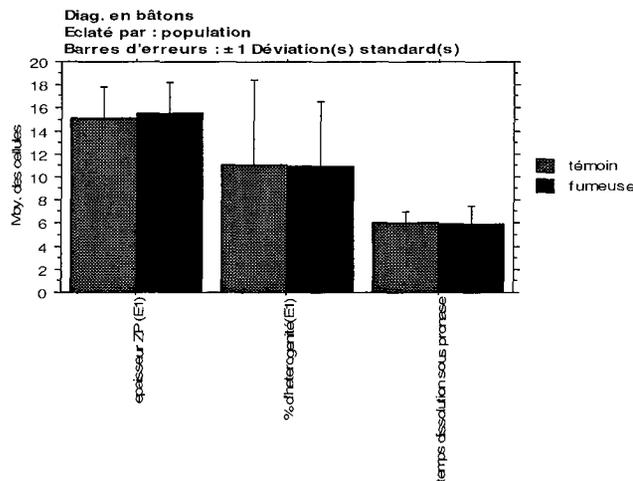


Figure 18 : Caractéristiques physicochimiques de la ZP des ovocytes et des embryons.

En effet, il n'y a pas de différence significative concernant l'épaisseur moyenne de la ZP des embryons transférés et celle des autres embryons de la cohorte entre les fumeuses actives et les non fumeuses (respectivement 15,39 $\mu$ m vs 15,03 $\mu$ m et 14,83 $\mu$ m vs 15,61 $\mu$ m).

On remarquera que le temps de dissolution sous l'action de la pronase est identique à celui rapporté par Loret de Moya (37) et semble être une caractéristique de l'embryon humain.

Lorsque l'on s'intéresse aux fumeuses importantes (taux des métabolites de la cotinine folliculaire > 200 ng/ml), on n'observe pas sur leurs embryons transférés (n = 10) une augmentation significative de l'épaisseur moyenne de la ZP par rapport aux embryons des fumeuses modérées (épaisseur ZP : 15,57 vs 15,33  $\mu$ m).

#### 4.1.4 Résultats de la FIV :

Les 46 ponctions ont abouti à 46 transferts de 82 embryons.

En utilisant soit la FIV conventionnelle soit l'ICSI, 192 ovocytes (68 %) ont été fécondés normalement, c'est-à-dire vus au stade de 2 PN à J1.

Le taux de fécondation n'était pas statistiquement différent entre les fumeuses actives et les non fumeuses (61% vs 75%). Il en est de même pour le taux de clivage (95,21% vs 98,56%).

Une moyenne de 1,78 embryons a été transférée et 13 grossesses uniques ont été obtenues.

La différence observée pour les taux de grossesses par transfert (22% vs 35%) et pour les taux d'implantation par embryon transféré (12% vs 20%) n'est pas statistiquement significative entre les fumeuses actives et les non fumeuses sur cette petite série.

	<u>FUMEUSES ACTIVES</u>	<u>NON FUMEUSES</u>
Nombre de ponctions	23	23
Nombres ovocytes matures	129	155
Taux de fécondation (2PN) (%)	61 %	75 %
Taux de fécondation anormale (%)	3 %	6 %
Taux de clivage (%)	95,21%	98,56 %
Nombre moyen d'embryons transférés	1,78	1,78
Taux implantation / Embryon transféré (%)	12% (5 / 41)	20% (8 / 41)
Nombre grossesses cliniques	5	8
Taux grossesses cliniques/ transfert	22% (5 / 23)	35% (8 / 23)

Tableau VI : Résultats de la FIV entre les fumeuses actives et les non fumeuses.

#### **4.1.5 Effet de l'observation :**

Des observations multiples ou trop longues des embryons peuvent être délétères. Les résultats obtenus lors de transferts, pour lesquels la mesure de l'épaisseur de la ZP n'a pas été réalisée ont été comparés à ceux obtenus lors de transferts pour lesquels la mesure de l'épaisseur de la ZP a été réalisée.

Les taux de grossesse par transfert ainsi que les taux d'implantation ne sont pas différents lorsque la mesure de la ZP des embryons transférés a été réalisée ou non (d'après le test du chi-deux).

	<b>AVEC MESURE ZP</b>	<b>SANS MESURE ZP</b>
Nombre de ponctions	78	51
Nombres d'E. transférés	139	90
Taux implantation (%)	16,5%	14,5%
Taux grossesse/ transfert (%)	24,6 %	21,6 %

Tableau VII : Comparaison des taux de grossesse et d'implantation avec ou sans mesure de l'épaisseur de la ZP des embryons transférés.

## 4.2 Population fumeuses passives domestiques :

### 4.2.1 Caractéristiques des populations étudiées :

L'imprégnation tabagique peut également être due au tabagisme du conjoint. Nous avons donc étudié cette population de femmes en comparant ce groupe de patientes fumeuses passives (n= 13) au groupe des patientes non fumeuses.

Ces femmes ont été appariées selon les mêmes paramètres précédemment cités.

Les caractéristiques de ces populations sont présentées dans le tableau VIII.

	<u>FUMEUSES PASSIVES CONJOINT</u>	<u>NON FUMEUSES</u>
Nombre patientes	13	13
Age patientes (année)	36,83 +/- 3,85	37,25 +/- 3,79
Durée stimulation (J)	11,08 +/- 2,23	11,41 +/- 1,16
Estradiolémie (pg/mL)	2460 +/- 1221	2418 +/- 982
Doses gonadotrophines (UI)	3189 +/- 1161	2864 +/- 1346
Nombre ovocytes recueillis	7,25 +/- ,75	8,25 +/- 2,52
Nombre MII	5,91 +/- 3,34	6,00 +/- 1,75
Nombre Embr. Transférés	1,91 +/- 0,51	1,91 +/- 0,51

Tableau VIII : Caractéristiques des populations : fumeuses passives conjoint et non fumeuses.

#### 4.2.2 Imprégnation tabagique :

Cette imprégnation a été évaluée grâce à l'interrogatoire, au taux de CO expiré et aux taux des métabolites de la cotinine dans le sérum et le fluide folliculaire.

On constate que l'intoxication passive des femmes par leurs conjoints est modérée puisque des taux faibles de métabolites de la cotinine <10ng/ml dans le fluide folliculaire ont été retrouvés, semblables à ceux des non fumeuses.

	<u>FUMEUSES PASSIVES CONJOINT</u>	<u>NON FUMEUSES</u>
Taux de CO expiré (ppm)	2,66 +/- 1,30	2,83 +/- 1,40
Taux métabolites cotinine sérique (ng/ml)	< 10	< 10
Taux métabolites cotinine fluide folliculaire (ng/ml)	< 10	< 10

Tableau IX : Evaluation imprégnation tabagique.

#### 4.2.3 Caractéristiques physicochimiques de la ZP :

On a donc pu comparer les caractéristiques physicochimiques de la ZP entre les 2 populations

<u>ZONE PELLUCIDE</u>	<u>FUMEUSES PASSIVES</u>	<u>NON FUMEUSES</u>
Epaisseur moyenne * (µm) embryons transférés	14,9 +/- 2,03	14,23 +/- 1,96
Coeff. de variabilité ZPTV (%) Embryons transférés	12,09 +/- 7,91	11,76 +/- 5,72

\* L'épaisseur moyenne a été calculée sur les embryons avant leur transfert (µm).

Tableau X: Caractéristiques physicochimiques de la ZP des embryons.

La comparaison des caractéristiques physicochimiques de la ZP entre les 2 groupes de patientes n'a pas retrouvé de différence significative. En effet, l'épaisseur moyenne de la ZP et le coefficient de variabilité de la ZP des embryons transférés entre les fumeuses passives domestiques et les non fumeuses ne diffèrent pas de manière statistiquement significative (respectivement 14,9µm vs 14,23µm et 12,09% vs 11,76%).

#### 4.2.4 Résultats de la FIV :

	<u>FUMEUSES PASSIVES CONJOINT</u>	<u>NON FUMEUSES</u>
Nombre de ponctions	13	13
Nombres ovocytes matures	71	72
Taux de fécondation (2PN) (%)	64,7 %	63,8 %
Taux de fécondation anormale (%)	8,4 %	9,7 %
Taux de clivage (%)	90,5 %	100 %
Nombre moyen d'embryons transférés	1,91 +/- 0,51	1,91 +/- 0,51
Taux implantation / Embryon transféré (%)	14 % (3 / 23)	18 % (4 / 23)
Nombre grossesses cliniques	3	4
Taux grossesses cliniques/ transfert	23 % (3/13)	31 % (4/13)

Tableau XI : Résultats des FIV pour les fumeuses passives conjoint et les non fumeuses.

Les 26 ponctions ont abouti à 26 transferts de 46 embryons. Le taux de fécondation n'était pas statistiquement différent entre les fumeuses passives et les non fumeuses (64,7% vs 63,8%). Il en est de même pour le taux de clivage (90,5% vs 100%).

Une moyenne de 1,91 embryons a été transférée et 7 grossesses uniques ont été obtenues.

La différence observée pour les taux de grossesses clinique par transfert (23% vs 31%) et pour les taux d'implantation par embryon transféré (14% vs 18%) n'est pas statistiquement significative entre les fumeuses et les non fumeuses sur cette petite série.

### **4.3 Population fumeuses passives environnement :**

Dans cette population, seulement 3 patientes cas ont été retenues.

	<b><u>Fumeuses Passives Environnement</u></b>	<b><u>Non Fumeuses</u></b>
Epaisseur moyenne * (µm) embryons transférés	14,95 +/- 3,17	14,83 +/- 3,17
Coeff. de variabilité ZPTV (%) Embryons transférés	12,66 +/- 7,2	10 +/- 7,56

\* L'épaisseur moyenne a été calculée sur les embryons avant leur transfert (µm).

Tableau XII : Caractéristiques physicochimiques de la ZP des embryons.

La comparaison des caractéristiques physicochimiques de la ZP entre les 2 groupes de patientes n'a pas retrouvée de différence significative. En effet, l'épaisseur moyenne de la ZP et le coefficient de variabilité de la ZP des embryons transférés entre les fumeuses passives « environnement » et les non fumeuses ne diffèrent pas de manière statistiquement significative (respectivement 14,95µm vs 14,83µm et 12,66% vs 10%).

## 5 DISCUSSION :

On peut tout d'abord constater que, dans notre centre, la politique de prévention du tabagisme est efficace puisque seulement 10 % des femmes fument encore (23 fumeuses actives sur les 220 femmes pouvant être incluses dans cette étude). Et lorsqu'elles fument, elles fument modérément : le nombre de cigarettes fumées en moyenne est de 6,9 par jour. L'interrogatoire, même s'il évalue le nombre de cigarettes fumées par jour et la durée du tabagisme n'est pas suffisant pour évaluer l'imprégnation tabagique.

Pour préciser l'importance de cette imprégnation, nous avons utilisé l'analyseur de CO qui se révèle être pour notre étude un instrument de mesure moins intéressant que nous l'aurions pensé. En effet, la mesure du taux de CO était réalisée avant le transfert des embryons qui se déroule en milieu de matinée. La plupart des femmes ne fument pas le matin et le taux de CO mesuré n'était pas augmenté puisqu'il est le reflet de l'intoxication des quelques heures précédents la mesure. De plus, les fumeuses ont bénéficié 48 heures avant d'une anesthésie générale et c'est souvent le début du sevrage tabagique. La mesure du taux est donc une mesure rapide, non invasive et peu coûteuse mais n'est le reflet de l'imprégnation tabagique que des heures précédent la mesure. Il faut donc l'associer à un autre marqueur de l'imprégnation tabagique.

Le dosage des métabolites de la nicotine, telle la cotinine est un bon marqueur de l'imprégnation tabagique puisque toutes les patientes fumeuses actives ont eu des taux détectables ( $\geq 10$  ng/ml) à la différence des non fumeuses. C'est donc un bon marqueur de l'imprégnation tabagique active. Comme il existe une bonne corrélation entre les taux sériques et folliculaires des métabolites de la nicotine, on peut donc penser que le dosage sérique suffit. Le sérum est un milieu biologique beaucoup plus « accessible » que le fluide folliculaire !

Il existe différentes techniques de dosages de la cotinine et des métabolites de la nicotine. La technique de référence (seuil de détection de 7,5  $\mu$ g/L et meilleure spécificité) est la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) associée à un détecteur à ultraviolet mais elle est difficilement automatisable et donc difficilement utilisable en technique de routine, même si l'étude de Jacob *et al* montre une transférabilité des résultats interlaboratoires globalement satisfaisante. De plus, la HPLC-UV apparaît comme une méthode suffisamment sensible pour mesurer les concentrations observées dans l'urine des sujets soumis au tabagisme passif. Il s'avère cependant nécessaire de combiner deux étapes de purification (56).

L'imprécision importante constatée dans les concentrations inférieures à 0,2 mg/L avec la trousse Cotinine Enzyme Immunoassay® (Diagnostic Reagent Inc®) rend son utilisation inappropriée pour le dépistage du tabagisme passif (56). Les concentrations de cotinine urinaire obtenues avec les trousse d'immunodosage en phase homogène sont plus élevées qu'en HPLC-UV. En effet, les anticorps réagissent de façon croisée mais partielle (50%) avec la 3-hydroxycotinine comme le précise la fiche technique de Diagnostic Reagent Inc®. Or, la 3-hydroxycotinine correspond à 30% environ des métabolites urinaires de la nicotine, la cotinine n'en représentant que 15%. De plus, les concentrations de 3-hydroxycotinine et de cotinine peuvent varier dans un rapport allant de 2 à 7 selon les sujets. Ceci explique la corrélation relativement médiocre avec la HPLC-UV (56).

Les concentrations obtenues avec la trousse Métabolites de la nicotine® de DPC France® sont plus élevées que celles observées sur les mêmes échantillons d'urine avec les techniques en phase homogène, les anticorps permettant de révéler un spectre plus large de métabolites de la nicotine (56). Cette technique est donc un bon compromis, pour l'évaluation de l'imprégnation tabagique active, entre les performances analytiques et les aspects pratiques (automatisation, rapidité de rendu des résultats), mais ne permet pas une évaluation de l'imprégnation tabagique passive (limite de détection de 0,01 mg/L).

En effet, on constate dans notre étude que, concernant les fumeuses passives, d'après les biomarqueurs, il n'existe pas d'imprégnation tabagique (taux de métabolites de la nicotine indétectables par immuno-analyse). En revanche, on note une réduction, même si elle n'est pas statistiquement significative pour cette petite série d'une part, des taux d'implantation (passant de 18 % pour les fumeuses passives dus au tabagisme de leur conjoint à 14 % pour les non fumeuses) et d'autre part des taux de grossesses cliniques par transfert (passant de 31 % pour les fumeuses passives à 23 % pour les non fumeuses). Cela soulève le problème de la limite de sensibilité de la technique utilisée.

Zenzes et al (66) a montré que la cotinine s'accumulait dans les follicules en maturation des fumeuses régulières et pouvait alors interagir directement avec les cellules du follicule et de l'ovocyte au cours de sa croissance et de sa maturation.

Dans l'étude de Shiloh et al (1), la ZP des ovocytes des patientes fumeuses actives ou passives est significativement plus épaisse ( $\geq 20\mu\text{m}$  en moyenne) que celle des non fumeuses ( $15\mu\text{m}$  en moyenne). Cette différence ne s'expliquant ni pour l'âge, ni pour le niveau basal de FSH plasmatique, ni par la réponse à la stimulation qui sont identiques entre les différents groupes, ne peut être corrélée, d'après les auteurs, qu'à la consommation de tabac. Cette épaisseur accrue de la ZP pourrait altérer le processus de fécondation puisque les ovocytes fécondés en FIV ont une ZP plus fine que les non fécondés (36). Pour

Bertrand et al, l'épaisseur de la ZP est une caractéristique intrinsèque de chaque ovocyte, témoignant de sa fécondabilité et n'est que faiblement influencée par la stimulation ovarienne. Si l'intoxication tabagique chronique modifie les caractéristiques physiques de la ZP, elle pourrait être responsable d'une réduction des taux de fécondation in vivo et in vitro. Cependant, l'étude de Shiloh ne comporte aucune donnée sur les résultats biologiques de la FIV et, les travaux de Hugues (10) et de Sterzik (11) n'ont pas montré de chute des taux de fécondation chez les patientes fumeuses.

L'amincissement naturel de la ZP dans les 48 heures qui suivent la fécondation ne semble pas influencé par le tabagisme et la ZP des embryons des femmes fumeuses est donc d'après Shiloh et al, plus épaisse que celle des embryons des femmes non fumeuses.

L'épaisseur de la ZP étant considérée comme un des principaux facteurs pouvant influencer les capacités d'éclosion d'un embryon (Cohen, 42), on peut penser qu'une intoxication tabagique, entraînant un accroissement d'épaisseur de la ZP, serait responsable de difficultés d'éclosion expliquant en partie le retentissement délétère du tabac sur l'implantation et la fertilité féminine. On disposerait alors, avec l'éclosion assistée d'un outil thérapeutique susceptible de contre balancer cet effet.

Malheureusement, dans notre étude, contrairement aux constatations de Shiloh (1), le tabagisme actif ou passif ne semble pas entraîner une quelconque modification dans les caractéristiques physicochimiques de la ZP, que ce soit son épaisseur moyenne, la variabilité de cette épaisseur ou sa capacité de résistance aux enzymes protéolytiques. Les taux de fécondation en FIV classique sont d'ailleurs identiques dans les groupes fumeuses et non fumeuses (59 % vs 65 %).

Nous observons cependant, même si elle n'est pas statistiquement significative dans cette petite série, une réduction des taux d'implantation (12% vs 20%) et de grossesse par ponction (22% vs 35%) entre les fumeuses actives et les non fumeuses, ce qui rejoint les constatations de la littérature (voir paragraphe 2-a).

Cet impact potentiellement négatif du tabac n'est pas due, d'après notre étude, à une modification de la ZP embryonnaire qui n'est pas altérée par un tabagisme modéré. C'est en effet la différence essentielle entre nos données et celles de Shiloh et al (1) qui définit les fumeuses actives comme fumant plus de 10 cigarettes par jour. Dans notre étude, seules 4 patientes peuvent être considérées comme ayant une imprégnation tabagique sévère ( $\geq 200$  ng/ml de métabolites de la cotinine dans le fluide folliculaire). L'épaisseur moyenne de la ZP des embryons de ces patientes n'était cependant que de 15,57  $\mu\text{m}$  comparée à plus de 18  $\mu\text{m}$  dans la série de Shiloh pour les fumeuses actives et passives.

Curieusement, il n'y a dans l'étude de Shiloh, aucune différence d'épaisseur de la ZP embryonnaire entre fumeuses actives et passives (la zone pellucide des ovocytes à JO pour les fumeuses actives est de 20,1µm alors qu'elle est de 20,6µm pour les fumeuses passives) alors que ces dernières devraient théoriquement présenter une intoxication moins sévère. C'est d'ailleurs une des limites de ce travail que de ne se baser que sur l'interrogatoire et non sur des données objectives pour évaluer la consommation tabagique.

## **6 CONCLUSION :**

Même si le tabac n'avait aucun impact sur les caractéristiques physicochimiques de la ZP, les arguments en faveur de son retentissement négatif sur la fertilité féminine plaident pour une prévention accrue de l'intoxication tabagique active et passive avant toute Assistance Médicale à la Procréation.

A l'hôpital Tenon, cette politique de prévention du tabagisme est efficace puisque nous n'avons pu recruter que 23 patientes fumeuses actives et 16 patientes fumeuses passives au cours de 4 mois pendant lesquels notre étude a duré.

## **7 BIBLIOGRAPHIE :**

- 1- **Shiloh H., LahavBaratz S., Koifman M. et al.** The impact of cigarette smoking on zona pellucida thickness of oocyte and embryos prior to transfer into the uterine cavity. *Hum Reprod* 2004 ; 19 : 157-9.
- 2- **World Health Organization**, Tobacco on Health. A global status report. Geneva; 1997.
- 3- **Comité français d'éducation pour la santé.** Assurance maladie. Paris : femmes et tabac ; 2000.
- 4- **Bolumar F., Olsen J., Bodsén J.** Smoking reduces fertility : a european multicenter study on infertility and subfertility. *Am J Epidemiol* 1996 ; 143 : 578-87.
- 5- **Augood C., Duckitt K., Templeton A.A.** Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Human Reprod* 1998 ; 13 : 1532-9.
- 6- **Hull M.G., North K., Taylor H. et al.** The avon longitudinal study of pregnancy and childhood study team *Fertil Steril* 2000; 4 : 725 – 33.
- 7- **Weinberg C., Wilcox A J , Baird D.D.** Reduced fecundability in women with prenatal exposure to cigarette smoking. *Am J Epidemiol* 1989 ; 129 : 1072-8.
- 8- **de Mouzon B, Spira A., Schartz D.** A prospective study of the relation between smoking and fertility. *Int J Epidemiol* 1988; 17 : 378 – 84.
- 9- **Klonoff-Cohen H., Natarajan L., Marrs R. et al.** Effects of female and male smoking on success rates of IVF and gamete intra-Fallopian transfer. *Human Reprod* 2001 ; 16:1382-90.
- 10- **Hugues E.G., Yeo J., Claman P. et al.** Cigarette smoking and the outcomes of in vitro fertilization: measurement of effect size and levels of action. *Fertil Steril* 1994; 64 : 807-814.
- 11- **Sterzik K., Strehler E., De Santo M. et al.** Influence of smoking on fertility in women attending an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1996; 65 :810-14.
- 12- **Saraiya M., Berg C.J., Kendrick J.S. et al.** Cigarette smoking as a risk factor for ectopic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998 ; 178 : 493-8.
- 13- **DiCarlantonio G., Talbot P.** Inhalation of mainstream and sidestream cigarette smoke retards embryo transport and slows muscle contraction in oviducts of hamsters(*Mesocricetus auratus*). *Biol Reprod* 1999;61 : 651-6.
- 14- **Knoll M., Talbot P.** Cigarette smoke inhibits oocyte cumulus complex pick-up by the oviduct *in vitro* independent of ciliary beat frequency. *Reprod Toxicol* 1998; 12 : 57-68.
- 15- **Talbot P., Geiske C., Knoll M.** Oocyte pickup by the mammalian oviduct. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 5- 8.
- 16- **Baron J.A.** The antioestrogenic effect of cigarette smoking in women. *Am J. Obst Gynecol* 1990 ; 162 :502-14.

- 17- **Cooper G.S., Baird D., Hulka B. et al.** Follicle-Stimulating Hormone concentrations in relation to active and passive smoking. *Obstretic Gynecology* 1995 ; 85 : 407-11.
- 18- **Sahara F.I., Beatse S.N., Leonardi M.R. et al.** Cigarette smoking accelerates the development of diminished ovarian reserve as evidenced by the clomiphene citrate challenge test. *Fertil Steril* 1994; 62 : 257 -62.
- 19- **Zenzes M.T.** Smoking and reproduction : gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod* 2000 ; 6 (suppl 2) :122-31.
- 20- **Weiss T., Eckert A.** Cotinine levels in follicular fluid and serum of IVF patients : effects on granulosa-luteal cell function in vitro. *Human Reprod* 1989 ; 4 : 482-5.
- 21- **Zenzes M.T., Reed T.E., Casper R.F.** Effects of cigarette smoking and age of maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 1997; 12 : 1736 – 41.
- 22- **Zenzes M.T., Wang P., Casper R.F.** Cigarette smoking may affect meiotic maturation of human oocytes. *Human Reprod* 1995; 10: 3213-7.
- 23- **Pawolski T., Clarke R.N., Hornstein M.D.** Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle. *Human Reprod* 2002; 17 : 921-5.
- 24- **International Agency of Research on Cancer.** Tobacco smoking. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals in humans. 1998; 38: 47-81.
- 25- **Zenses M.T., Puy L. and Reed T.E.** Immunodetection of benzo(a)pyrene in granulosa lutein cells of passive smoker women. *Mol Human Reprod* 1998; 4 : 159-65.
- 26- **Matzuoka A., Ozaki M., Takeshita K. et al.** Aneuploidy induction by benzo(a)pyrene and ployploidy induction by 7, 12-dimethylbenzo(a)anthracene in Chinese hamster cell lines V79-MZ and V79. *Mutagenesis* 1997; 12, 365-72.
- 27- **Zenzes M.T., Wang P., Casper R.F.** Cigarette smoking may affect meiotic maturation of human oocytes. *Human Reprod* 1995; 10: 3213-7.
- 28- **Jordan A., Hadfield J.A., Lawrence N.J., McGown A.T.** Tubulin as a target for anticancer drugs :agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev.* 1998 ; 18: 259-96.
- 29- **Wassarman P.M.** Zona pellucida glycoproteins. *Ann Rev Biochem* 1988 ; 57 : 415 – 42.
- 30- **Harris J.D., Hibler D.W., Fontenot G.K.** Cloning and characterisation of zona pellucida genes and cDNA from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA seq* 1994; 4: 361 – 93.
- 31- **Lefièvre L., Conner S.J., Salpekar A. et al.** Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Repord* 2004; 19: 1580 – 6.
- 32- **Wassarman P.M., Litscher E.S.** Sperm-egg recognition mechanisms in mammals. *Curr Topics Dev Biol* 1995; 30: 1- 19.
- 33- **Bleid J.D., Wassarman P.M.** Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* 1983; 95 : 317 – 24.

- 34- **Bleid J.D., Greve J.M., Wassarman P.M.** Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida role in maintenance binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev Biol* 1988; 128 : 376 – 85.
- 35- **Adham I.M., Nayernia K., Engel W.** Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol Reprod Dev* 1997; 46 : 370 – 6.
- 36- **Rankin T., Talbot P., Lee E.** Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* 1999; 126 : 3847 – 55.
- 37- **Loret de Mola. J.R., Garside W.T., Bucci J.** Analysis of the human zona pellucida during culture: correlation with diagnosis and the preovulatory hormonal environment *J Assist Reprod Genet* 1997; 14 : 332 - 6.
- 38- **Pelletier C., Keefe D.L., Trimarchi J.R.** Non invasive polarized light microscopy quantitatively distinguished the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertil Steril* 2004; 81: 850 – 6.
- 39- **Bertrand E., Van der Bergh M., Englert Y.** Clinical parameters influencing human zona pellucida thickness. *Fertil Steril* 1996 ; 66 : 408 – 11.
- 40- **Cohen J., Wiener K.E., Wright G.** Prognosis value of morphologic characteristics of cryopreserved embryos: a study using videocinematography. *Fertil Steril* 1988 ; 49 : 827- 34.
- 41- **Cohen J., Inge K.L., Suzman M.** Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989 ; 51 : 877 – 8.
- 42- **Fong C.Y., Bongso A., Sathananthan H et al.** Ultrastructural observations of enzymatically treated human blastocyst: zona-free blastocyst transfer and rescue of blastocysts with hatching difficulties. *Human reprod* 2001; 3 : 540 – 6.
- 43- **Mandelbaum J.M.** The effect of assisted hatching on the hatching process and implantation. *Human Reprod* 1996; 11 : 43 - 50.
- 44- **Primi M.P., Senn A., Montag M. et al.** A european multicentre prospective randomized study to assess the use of assisted hatching with the diode laser and the benefit of an immunosuppressive/antibiotic treatment in different patient populations. *Human Reprod* 2004; 10 : 2325 – 33.
- 45- **Ness R.B., Grisso J.A., Hirschinger N. et al.** Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med* 1999; 4 : 333 – 9.
- 46- **Mishra G.D., Dobson A.J., Schofield M.J.** Cigarette smoking, menstrual symptoms and miscarriage among young women. *Aust N Z Public Health.* 2000; 24(4): 413-20.
- 47- **Gomez C., Berlin I., Marquis P.** Expired air carbon monoxide concentration in mothers and their spouses above 5 ppm is associated with decreased fetal growth. *Prev Med* 2005; 40 : 10 – 5.



- 48- **Ananth C.V., Smulian J.C., Vintzileos A.M.** Incidence of placental abruption in relation to cigarette smoking and hypertensive disorders during pregnancy: a meta-analysis of observational studies. *Obstet Gynecol* 1999; 93 : 622 – 8.
- 49- **Shah N.R., Bracken M.B.** A systematic review and meta-analysis of prospective studies on the association between maternal cigarette smoking and preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182 : 465 – 72.
- 50- **Benowitz N.L.** Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev.* 1996; 18: 188 – 204.
- 51- **Watkins S.S., Koob G.F., Markoli A.** Neuronal mechanisms underlying nicotine addiction: acute positive reinforcement and withdrawal. *Nicotine Tobacco Res* 2000; 2: 19 – 37.
- 52- **Lebargy F.** La dépendance à la nicotine. *Rev Pneumol Clin* 2000; 56: 177 – 83.
- 53- **Byrd G.D., Chang K., Greene M., Don de Bethizy J.** Evidence for urinary excretion of glucuronide conjugates of nicotine, cotinine and trans-3- hydroxycotinine in smokers. *Drugs Metab Dispos* 1992; 20 : 192 – 7.
- 54- **Benowitz N.L., Peyton J.** Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 56: 483 – 93.
- 55- **Seccareccia F., Zuccaro P., Pacifici R. et al.** Research group of the MATISS Project. Serum cotinine as a marker of environmental tobacco smoke exposure in epidemiological studies: the experience of the MATISS Project. *Eur J Epidemiol* 2003; 18: 487 – 92.
- 56- **Jacob N., Berny C., Boyer J.C. et al.** Dosage urinaire de la cotinine et des métabolites de la nicotine. *Ann Biol Clin* 2005 ; 63 : 397 – 409.
- 57- **Behera D., Uppal R., Majumdar S.** Urinary levels of nicotine and cotinine in tobacco users. *Indian J Med Res* 2003 ; 118 : 129 – 33.
- 58- **Bourlay S.G., Benowitz N.L., Forbes A. et al.** Determinants of plasma concentrations of nicotine and cotinine during cigarette smoking and transdermal nicotine treatment. *Eur J Clin Pharmacol* 1997; 51: 407 – 414.
- 59- **Etter J.F., Vu Duc T., Perneger T.V.** Saliva cotinine levels in smokers and non-smokers. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 251 – 8.
- 60- **Wirth N., Abou- Hamdan K., Spinosa A. et al** Le tabagisme passif. *Rev Pneumol Clin* 2005 ; 61 : 7 -15.
- 61- **Berny C., Boyer J.C., Capolaghi B. et al.** Les marqueurs spécifiques du tabagisme. *Ann Biol Clin* 2002 ; 60 : 263 – 72.
- 62- **Parant F., Moulisma M., Lardet G. et al.** Nicotine metabolites in urine : assesment of EIA « Cotinine » Microgenics and Immulite 2000 « Nicotine métabolite » DPC in comparison with colorimetric method. *Immunoanal Biol Spec* ; 2003: 18 : 218 – 24.

- 63- **Benowitz N.L., Jacob P., Fong I. et al.** Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268: 296 – 303.
- 64- **Hym B., Capolaghi B.** Adaptation urinaire du test « Métabolites de la nicotine » sur Immulite 2000. Lyon : Corata, 2002.
- 65- **Merviel P., Antoine J.A., Mathieu E. et al.** Luteinizing hormone concentrations after gonadotropin-releasing hormone antagonist administration do not influence pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2004; 82 : 119 – 25.
- 66- **Zenzes M.T., Reed T.E., Wang P. et al.** Cotinine, a major metabolite of nicotine, is detectable in follicular fluids of passive smokers in IVF therapy. *Fertil Steril* 1996; 66 : 614 -19.
- 67- **Nizard J.** Quelles sont les données épidémiologiques concernant le tabagisme maternel et paternel? *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2005; 3S347 - 3S352.
- 68- **Gourlain H., Galliot-Guilley M.** Quels sont les marqueurs du tabagisme ? *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2005; 3S154 - 3S170.
- 69- **Benkirane S., Nicolas A., Galteau M.M. and Siest G.** Highly sensitive immuno-assay for the determination of cotinine in serum and saliva. Comparison between RIA and avidin-biotin ELISA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29 : 405 - 10.

VU

**NANCY, le 9 septembre 2005**

Le Président de Thèse

**Professeur H. GERARD**

**NANCY, le 9 septembre 2005**

Le Doyen de la Faculté de Médecine

Par délégation

**Mme le Professeur M.C. BENE**

**AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE**

**NANCY, le 12 septembre 2005**

**LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY 1**

**Professeur J.P. FINANCE**

---

## **RESUME DE LA THESE :**

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que le tabagisme actif et passif était associé à une diminution de la fertilité naturelle et des résultats obtenus en Assistance Médicale à la Procréation. La zone pellucide (ZP), qui joue un rôle important dans les processus de fécondation et d'implantation pourrait être modifiée par ce type d'intoxication. Nous avons étudié le retentissement du tabagisme, évalué par le dosage des métabolites de la cotinine dans le sérum et le fluide folliculaire (technique en chimiluminescence automatisée (Immulite 2000 de PDC®), sur les caractéristiques physicochimiques de la ZP de l'ovocyte (épaisseur moyenne, coefficient de variabilité de la ZP et temps de dissolution des ovocytes non fécondés sous l'action de la pronase) et les capacités d'implantation des embryons issus de ces ovocytes. 23 fumeuses actives et 16 fumeuses passives, prises en charge dans un programme de FIV ou d'ICSI ont été appariées à des non fumeuses. Ce dosage est un bon marqueur de l'intoxication tabagique puisque toutes les patientes fumeuses ont eu des taux de cotinine folliculaire détectables ( $\geq 10\text{ng/ml}$ ) à la différence des non fumeuses. Dans notre étude, on ne retrouve pas de différence significative ni pour l'épaisseur ni pour la sensibilité aux enzymes protéolytiques de la ZP entre les fumeuses actives, les fumeuses passives et les non fumeuses. Pourtant, le tabac a incontestablement un impact négatif sur la fertilité féminine et l'intoxication tabagique se reflète dans l'environnement direct de l'ovocyte (fluide folliculaire). Mais, il ne semble pas que cet effet délétère du tabac passe par le biais d'un impact sur la ZP ovocytaire.

---

## **TITRE EN ANGLAIS:**

**IMPACT OF ACTIVE AND PASSIVE SMOKING AND ZONA PELLUCIDA OF HUMAN'S OOCYTES.**

---

**THESE: MEDECINE SPECIALISEE- ANNEE 2005**

---

## **MOTS CLES:**

**Tabagisme actif et passif; zone pellucide; ovocyte ; AMP ; éclosion du blastocyste; cotinine sérique et folliculaire;**

---

## **INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R:**

**Faculté de Médecine de Nancy**

**9, avenue de la Forêt de Haye**

**54505 Vandoeuvre les Nancy Cedex**