Analyse de la constitution chromosomique des zygotes mono- et poly- pronucléés par hybridation in situ par fluorescence et confrontation au nombre de pronuclei observés

Elvina Pajaniapadeatchy

▶ **To cite this version:**

Elvina Pajaniapadeatchy. Analyse de la constitution chromosomique des zygotes mono- et poly-pronucléés par hybridation in situ par fluorescence et confrontation au nombre de pronuclei observés. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02945621

HAL Id: dumas-02945621

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02945621

Submitted on 22 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

université de BORDEAUX

U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2020 Thèse n°3063

THESE POUR L'OBTENTION DU

DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Par PAJANIAPADEATCHY Elvina

Né(e) le 11 juin 1989 à Sainte-Clotilde

Le 10 juillet 2020

Analyse de la constitution chromosomique des zygotes mono- et poly- pronucléés par Hybridation In Situ par Fluorescence et confrontation au nombre de pronuclei observés

Directeur de thèse:

Madame le Docteur Aline PAPAXANTHOS

Membres du jury :

M. le Professeur Clément JIMENEZ	Président
Mme le Professeur Sandrine DABERNAT	Examinateur
Mme le Docteur Lucie CHANSEL-DEBORDEAUX	Examinateur
M. le Docteur Jérôme TOUTAIN	Examinateur
Mme le Docteur Aline PAPAXANTHOS	Directeur de thèse

Rapporteur:

M. le Professeur Moncef BEN KHALIFA

université de BORDEAUX

U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2020 Thèse n°3063

THESE POUR L'OBTENTION DU

DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Par PAJANIAPADEATCHY Elvina

Né(e) le 11 juin 1989 à Sainte-Clotilde

Le 10 juillet 2020

Analyse de la constitution chromosomique des zygotes mono- et poly- pronucléés par Hybridation In Situ par Fluorescence et confrontation au nombre de pronuclei observés

Directeur de thèse:

Madame le Docteur Aline PAPAXANTHOS

Membres du jury :

M. le Professeur Clément JIMENEZ	Président
Mme le Professeur Sandrine DABERNAT	Examinateur
Mme le Docteur Lucie CHANSEL-DEBORDEAUX	Examinateur
M. le Docteur Jérôme TOUTAIN	Examinateur
Mme le Docteur Aline PAPAXANTHOS	Directeur de thèse

Rapporteur:

M. le Professeur Moncef BEN KHALIFA

Remerciements

A Monsieur le Professeur Clément Jimenez,

Je suis très honorée que vous ayez accepté la présidence de ce jury de thèse. Je vous remercie pour votre bienveillance, votre disponibilité, ainsi que votre aide plus que primordiale dans la mise en place et la réalisation de ce travail. Votre bonne humeur et votre gentillesse ont rendu d'autant plus agréable ce dernier semestre bordelais.

A Madame le Docteur Aline Papaxanthos,

Je vous suis très reconnaissante de m'avoir accordé votre confiance pour la réalisation de ce travail. Je vous remercie d'avoir su faire preuve de patience et de bienveillance tout au long de l'élaboration de ce projet, mais aussi cours de ces semestres dans votre service. Vos conseils et votre disponibilité ont été essentiels pour l'aboutissement de cette étude, malgré la distance et les difficultés rencontrées. J'espère m'être montrée digne de vos attentes.

A Madame le Docteur Lucie Chansel-Debordeaux,

Je te remercie de ton intérêt et de l'aide que tu as apporté à ce sujet. Merci pour ta grande gentillesse et ta bienveillance durant les deux semestres où j'ai eu l'opportunité de bénéficier de ta pédagogie, ton dynamisme et ta positivité. Tes enseignements pratiques et théoriques m'auront permit de progresser dans cette spécialité, et me serviront sans nul doute dans ma pratique future.

A Madame le Professeur Sandrine Dabernat,

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et de juger mon travail. Veuillez trouver dans ce projet, le témoignage de ma grande considération et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Jérôme Toutain,

Je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury de thèse et de juger ce travail. Merci pour votre disponibilité et votre implication lors des étapes initiales de cette étude. Soyez assurez de ma respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Moncef Ben Khalifa,

Je vous remercie pour votre aide et votre implication indispensables dans la réalisation de ce projet. Sans la gentillesse et la sympathie dont vous avez fait preuve à mon égard, ainsi que l'énergie que vous avez déployée pour la mise en place de projet, cette thèse n'aurait pas pu aboutir. Je vous remercie également de m'avoir fait l'honneur de relire et de critiquer ce manuscrit.

A l'équipe du laboratoire de Biologie de la Reproduction et cytogénétique du CHU d'Amiens,

Je vous remercie pour votre accueil et votre implication dans le déroulement de ce travail.

A l'équipe du laboratoire de Biologie de la Reproduction du CHU de Bordeaux,

Carole, Anna, Marianne, Hervé, Sylvie, Maïté, Jean-François, Marie-Caroline, Volcy, Véronique, Pascale, Cathy, Marie-Caroline, Patricia, Corinne, Juliette et Edouard, je vous remercie pour votre sympathie, votre gentillesse et votre pédagogie. Merci à ceux qui ont participé à la mise en place de ce projet. Cela a été une joie de travailler avec vous, même les matins d'hiver.

A mes collègues du Laboratoire de Saint-Benoît,

Je vous remercie de m'avoir si bien accueillie dans votre équipe. Merci d'avoir été si compréhensifs et de vous être adaptés à mes contraintes durant cette période de rédaction malgré votre charge de travail. J'espère pouvoir continuer à évoluer à vos côtés.

A ceux qui ont marqué mon internat et mon passage à Bordeaux,

Mes petits roumains Tania, Andreea et Valentin, merci pour votre joie de vivre, votre gentillesse et tous ces moments partagés que ce soit en stage ou en dehors. Ne changez rien.

Florian, merci pour toutes ces discussions et ces soirées, qui m'ont permis de prendre un peu confiance en moi. J'espère que nous aurons l'occasion d'en vivre d'autres lors de ta venue à la Réunion.

Charly, Jess, Titine et Benjamin, vous avez été pour nous comme la famille que nous n'avions pas près de nous. Merci pour tous ces moments de partage, merci pour votre soutien.

A mes amis de la Réunion,

Ginoux, tu as toujours cru en moi et tu m'as toujours poussé. Merci d'être là, même si la distance nous sépare.

Alex et Murielle, après toutes ces années, nous y sommes tous arrivés. Merci pour tous ces moments d'amitié, pour tous ces fous rires. Vous êtes les meilleurs.

A ma famille,

Mes parents, merci de m'avoir toujours soutenu et d'avoir tant donné pour me donner la possibilité de réussir dans la vie.

Alice et Isabelle, vous avez toujours été présentes pour me pousser et m'encourager lorsque j'en ai eu besoin. Je ne le dis pas assez souvent mais je vous remercie d'être des sœurs si formidables.

Enfin, à ma future femme,

Merci de m'avoir supporté toutes les fois où je me plaignais. Tu as toujours su voir en moi le meilleur, là où je ne voyais que l'échec. Merci de m'avoir relevé tant de fois durant toutes ces années d'études. J'ai hâte de vivre cette nouvelle page de notre vie auprès de toi.

Table des matières

TABLE DES ILLUSTRATIONS....10

LISTE DES ABREVIATIONS....11

INTRODUCTION ET OBJECTIF DE L'ETUDE....12

1. ETAT DES LIEUX DANS LA LITTERATURE....13

1.1 Mécanismes cytogénétiques et moléculaires aboutissant à une fécondation normale 14

1.1.1 Rappels : Divisions méiotiques et gamètes 14

1.1.2 Cas particuliers de l'ovogénèse 14

1.1.3 La fécondation normale et la mise en place des pronuclei 15

1.1.4 Blocage de la polyspermie 15

1.2 Mécanismes à l'origine de l'observation des aneuploïdies 16

1.2.1 Les zygotes triploïdes 16

1.2.2 Les zygotes monopronucléés 19

1.3 Les différents facteurs potentiellement impliqués dans la survenue d'une aneuploïdie au cours du développement embryonnaire 20

1.3.1 Les facteurs masculins 20

1.3.2 Les facteurs féminins : aneuploïdie et âge maternel avancé 24

1.3.3 Les facteurs liés à la procédure technique de FIV-ICSI 28

1.3.4 Les facteurs liés à la stimulation hormonale et au rendement ovocytaire 30

1.4 Différence de taille des pronuclei : retentissement sur l'embryon et facteurs favorisant ce dysmorphisme 31

1.4.1 Diamètre pronucléaire : normalité et limites biométriques 31

1.4.2 Facteurs favorisant la survenue d'une inégalité de taille entre les pronuclei 32

2. MATERIELS ET METHODES 35

2.1 Population de l'étude 36

2.1.1 Critères d'inclusion 36

2.1.2 Critères d'exclusion 36

2.1.3 Consentements des patients 36

2.2 Protocole de FIV-ICSI au laboratoire de FIV du CHU de Bordeaux 37

2.3 Observation, sélection et vitrification des zygotes 37

2.3.1 Observation et sélection 37

2.3.2 Vitrification 38

2.4 Fixation des zygotes et FISH 38

2.4.1 Choc hypotonique et dégradation de la zone pellucide 38
2.4.2 Fixation à l'acide acétique/méthanol et déshydratation 39
2.4.3 Réalisation de la technique FISH au laboratoire de cytogénétique du CHU d'Amiens 39
2.5 Lecture des lames 40
3. RESULTATS 41
3.1 Population analysée 42
3.2 Analyse des résultats après lecture des lames d'hybridation au microscope à fluorescence et confrontation aux observations morphologiques 42
3.2.1 Zygotes 1 PN 42
3.2.2 Zygotes 3 PN 43
3.2.3 Zygotes 2+1 PN 43
3.2.4 Zygotes 2 PN bloqué à J2 après une procédure d'aide à l'activation ovocytaire 43
4. DISCUSSION 48
5. CONCLUSION 54
BIBLIOGRAPHIE 56

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Discordance entre l'analyse des zygotes par FISH et le statut pronucléaire observé.....37

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Concordance des résultats obtenus après FISH par rapport au nombre de pronuclei observé 44
Tableau 2. Analyse cytogénétique des zygotes 45

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMP : Aide Médicale à la Procréation

ATP : Adénosine Triphosphate

CECOS : Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme Humain

CO_2 : Dioxyde de carbone

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

FIV : Fécondation In Vitro

FIV-ICSI : Fécondation In Vitro par Injection Intra-Cytoplasmique de Spermatozoïde

FSH: Follicle-stimulating Hormone

GnrH: Gonadotropin Releasing Hormone

hCG: Human Chorionic Gonadotropin

LH: Luteinizing Hormone

OATS : Oligoasthénotératozoospermie

PGS : Preimplantation Genetic Screening

PLCζ : Phospholipase C zeta

1 PN : Monopronucléé ou un pronucléus

2 PN : Bipronucléé ou deux pronuclei

3 PN : Tripronucléé ou trois pronuclei

4 PN : Tétrapronucléé ou quatre pronuclei

INTRODUCTION ET OBJECTIF DE L'ETUDE

Les techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) représentent un outil indispensable à la prise en charge de l'infertilité du couple. Dans cette optique, au quotidien dans les centres d'AMP, l'ensemble des équipes clinico-biologiques œuvre pour tenter de féconder *in vitro*, des gamètes qui n'y parviennent pas ou difficilement *in vivo*. Cependant, l'essor des procédures de Fécondation In Vitro (FIV) a mis l'accent sur des anomalies de fécondation, qui pour certaines ont été mises en lumière ou favorisées par les techniques employées. Ainsi, l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) a été impliquée dans l'apparition d'anomalies de nombre des pronuclei, menant d'une part à la formation de zygotes tripronucléés, en raison d'altérations de l'ovocyte et des mécanismes essentiels au bon déroulement de la deuxième division de la méïose (Macas *et al.*, 1996). D'autre part, la FIV-ICSI semble également favoriser la formation de zygotes monopronucléés par le biais d'une activation ovocytaire parthénogénétique impliquant le calcium présent dans le milieu d'injection (Feng et Hershlag, 2003). Les embryons issus de ces zygotes porteurs d'anomalies numériques des pronuclei sont considérés comme à risque majeur d'aneuploïdie uniquement sur la base du décompte des pronoyaux (Capalbo *et al.*, 2017). Ainsi, ces critères morphologiques déterminent le devenir de l'embryon, puisqu'afin de minimiser les risques d'échec d'implantation, de fausses couches ou d'autres complications, engendrées par des embryons aneuploïdes, seuls les embryons issus de zygotes présentant deux pronuclei avec extrusion du deuxième globule polaire sont généralement transférés (Papale *et al.*, 2012) selon la politique de chaque centre. Pourtant, des études ont démontré qu'une partie des embryons issus des zygotes possédant un nombre anormal de pronuclei est euploïde (Capalbo *et al.*, 2017). De ce fait, en se rapportant uniquement aux critères morphocinétiques actuels, il est possible d'éliminer un ou plusieurs embryons, qui pourraient aboutir à une grossesse normale et à la naissance d'un enfant en bonne santé. Cela représenterait donc une perte de chance pour le couple, puisque la présence d'une anomalie chromosomique, bien que fortement suspectée, ne peut être certifiée par l'utilisation seule de ces critères.

L'objectif de cette étude est d'analyser la composition chromosomique des zygotes présentant un ou plus de deux pronuclei à l'issu d'une procédure d'ICSI, à l'aide de sondes spécifiques des chromosomes X, Y et 18 par la technique d'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH), et de comparer ces résultats au nombre de pronuclei évalué au préalable par la simple observation.

1. ETAT DES LIEUX ACTUEL DANS LA LITTERATURE

1.1 Mécanismes cytogénétiques et moléculaires aboutissant à une fécondation normale

1.1.1 Rappels : Divisions méiotiques et gamètes

Les gamètes sont des cellules dites haploïdes, car elles possèdent un seul lot de chromosomes de chaque paire. L'haploïdie gamétique est essentielle pour le déroulement d'une fécondation normale, afin de garantir la transmission équilibrée des chromosomes à la cellule-œuf. Elle se met en place grâce à différentes étapes intégrées dans deux divisions méiotiques, qui ont lieu au cours de la spermatogénèse et de l'ovogénèse. Ainsi, deux divisions cellulaires vont se succéder, précédées d'une seule réplication de l'ADN avant la méiose I. A l'issue de la méiose, quatre cellules haploïdes seront formées, chacune constituée d'un seul représentant chromosomique de chaque paire et à une seul chromatide (Petronczki *et al.*, 2003)**.**

1.1.2 Cas particuliers de l'ovogénèse

Contrairement au processus méiotique masculin, la méiose féminine est discontinue, marquée par différentes interruptions au cours des divisions. En effet, après l'appariement des chromosomes homologues durant la prophase I, une couche de cellules de la granulosa entoure les ovocytes, constituant ainsi des follicules primordiaux. Après cette phase, les follicules primordiaux poursuivent leur croissance en restant bloqués au stade de prophase I. A ce stade, les chromosomes homologues sont alors contenus dans la vésicule germinative. A la puberté, lorsque les follicules primordiaux sensibles à la FSH deviennent des follicules préovulatoires et que le pic de LH se produit, la méiose reprend avec notamment la ségrégation des chromosomes homologues et l'expulsion d'un lot de chromosomes homologues de chaque paire au sein du premier globule polaire durant l'anaphase I. Le jeu de chromosome restant poursuit la division méiotique jusqu'à la métaphase II. La méiose s'interrompt une nouvelle fois, et ne reprendra qu'au moment de la fécondation de l'ovocyte (Herbert *et al.*, 2015)

1.1.3 La fécondation normale et la mise en place des pronuclei

Lors de la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte, un mécanisme moléculaire, marqué notamment par des oscillations calciques répétées (Rogers *et al.*, 2004), se met en route permettant la reprise de la méiose II. Ainsi, suite à la fécondation, l'achèvement de la méiose aboutit à la séparation des chromatides-sœurs de chaque chromosome homologue. La moitié sera exclue de la cellule pour former le deuxième corps polaire. Le matériel chromosomique maternel et paternel restant dans l'ovocyte fécondé, s'entoure individuellement d'une membrane nucléaire, formant ainsi les pronucléi maternel et paternel (Rosenbusch, 2008). La fécondation normale aboutit donc à la fusion de cellules haploïdes, qui formeront une cellule-œuf diploïde.

Par ailleurs, afin d'assurer une ségrégation normale des chromosomes lors des divisions mitotiques qui auront lieu dans l'embryon en devenir, l'ADN paternel, fortement compacté par la présence de complexes nucléoprotaminiques, va subir une décompaction parallèlement à la formation du pronucléus mâle (Clift et Schuh, 2013).

1.1.4 Blocage de la polyspermie

La fécondation d'un ovocyte par plus d'un spermatozoïde, entraîne un risque majeur d'aneuploïdie embryonnaire, généralement non viable et à l'origine souvent d'une perte de chance de grossesse. Cet évènement indésirable, appelé polyspermie, est normalement prévenue par des mécanismes de blocage de la polyspermie, qui se produisent lors de l'activation ovocytaire provoquée par la pénétration du spermatozoïde. Ces mécanismes reposent sur un enchainement de réactions, dont l'objectif est d'inhiber l'entrée de spermatozoïdes supplémentaires dans la cellule. Ainsi, l'introduction d'un facteur protéique, la phospholipase C zeta (PLCζ), induira la production d'inositol 1,4,5-trisphosphate et l'augmentation fluctuante du taux de calcium intracellulaire (Rogers *et al.*, 2004). Ces oscillations calciques, déclenchent une réaction corticale à l'origine de l'exocytose de granules situées au niveau de l'espace périvitellin. Cette exocytose provoquera à son tour des modifications structurales et biochimiques telles que le durcissement de la zone pellucide, qui sera secondaire à la conversion de la glycoprotéine ZP2 en ZP2f, empêchant ainsi la pénétration de spermatozoïdes surnuméraires dans l'ovocyte. En outre, la conversion de ZP2

en ZP2f et la perte de son extrémité N-terminale, empêchera également la liaison de nouveaux spermatozoïdes et donc leur pénétration dans la zone pellucide (Sun, 2003).

1.2 Mécanismes à l'origine de l'observation des aneuploïdies

1.2.1 Les zygotes triploïdes

La triploïdie est une anomalie caractérisée par la présence de trois copies de chaque chromosome (Rosenbusch, 2008) dans la cellule soit 69n au lieu de 46n chromosomes (n=23). Son existence est suspectée en présence de zygotes possédant trois pronuclei, dits tripronucléés. La survenue de zygotes tripronucléés au cours des procédures d'AMP est un évènement fréquent. Suite à une FIV-ICSI, l'incidence de la triploïdie a été rapportée à 6,2% par certains auteurs (Macas *et al.*, 1996) et 6,5% par d'autres (Staessen et Van Steirteghem, 1997). Cette incidence semble légèrement diminuée à la suite d'une procédure de FIV conventionnelle avec un taux de 5% rapporté par Pieters *et al.*, (1992). Les mécanismes à l'origine de la survenue de cette anomalie de nombre semblent donc différer selon la technique utilisée, mais aussi en fonction de paramètres intrinsèques propres aux individus.

1.2.1.1 Origine diandrique

L'origine diandrique désigne le matériel chromosomique paternel comme facteur responsable de la survenue de la triploïdie. Les zygotes qui présentent une triploïdie d'origine paternelle auront trois combinaisons chromosomiques sexuelles possibles : XXX, XXY ou XYY (Rosenbusch, 2008). Les mécanismes qui sous-tendent l'origine diandrique de la triploïdie sont divers.

- La polyspermie

La fécondation anormale d'un ovocyte haploïde par deux spermatozoïdes haploïdes résulte d'un défaut des mécanismes de blocage de la polyspermie. Parmi les mécanismes, des anomalies de la réaction corticale ou encore une fragilité accrue de la zone pellucide

survenant lors de la récupération ou de la manipulation des follicules ont été évoquées dans la littérature pour expliquer l'échec du blocage (Rosenbusch *et al.*, 1997). Cela conduit à la formation d'un zygote contenant deux pronuclei d'origine paternelle et d'un seul pronucléus maternel, associés à la présence de deux globules polaires dans l'espace périvitellin. La survenue de cette anomalie serait favorisée chez les patients normozoospermiques et serait donc la cause principale de formation des zygotes tripronucléés lors des procédures de FIV conventionnelle, car l'ovocyte est exposé à un grand nombre de spermatozoïdes. A contrario, cet évènement ne devrait pas survenir dans les procédures de FIV-ICSI puisqu'un seul spermatozoïde est injecté dans l'ovocyte (Rosenbusch, 2008).

- Erreur de la méiose II masculine et diploïdie

La diploïdie spermatique se caractérise par la présence de deux lots de chromosomes dans un spermatozoïde censé être haploïde. A l'inverse de la polyspermie, cette anomalie se rencontre plus fréquemment chez les hommes atteints d'oligotératozoospermie sévère, de cryptozoospermie ou d'azoospermie, ce qui implique en général une prise en charge du couple et de leurs gamètes en FIV-ICSI. La fécondation de l'ovocyte par un spermatozoïde diploïde conduit à la formation d'un zygote avec deux pronuclei et deux globules polaires, lorsque l'expulsion du second corps polaire se fait correctement. Si tel est le cas, l'anomalie peut alors passer inaperçue, donnant un zygote morphologiquement normal si l'on s'en tient au décompte des pronoyaux. Néanmoins, d'un point de vue cytogénétique, la cellule sera constituée d'un complément chromosomique haploïde d'origine paternelle (Rosenbusch, 2008).

1.2.1.2 Origine digynique

L'origine digynique désigne le matériel chromosomique maternel comme facteur responsable de la survenue de la triploïdie. Les zygotes qui présentent une triploïdie d'origine maternelle auront deux combinaisons chromosomiques sexuelles possibles : XXX, XXY et ne peuvent donc pas avoir deux composants chromosomiques Y. Là aussi, comme précédemment, les mécanismes varient.

- Diploïdie ovocytaire et non-extrusion du second globule polaire

Le défaut d'expulsion du deuxième corps polaire est décrit comme l'une des causes principales de formation des zygotes tripronucléés. Dans une publication, Grossman *et al.*, (1997) retrouvent un ratio Y/X de 0,206 en analysant par FISH des zygotes tripronucléés, appuyant ainsi la théorie de la non-extrusion du deuxième corps polaire comme origine de la tripronucléation du zygote. Plusieurs publications ont mis l'accent sur l'implication des procédures de FIV-ICSI dans la survenue de cet évènement, par le biais d'une altération des fuseaux méiotiques (Staessen et Van Steirteghem, 1997, Rosenbusch, 2008). Le second corps polaire non expulsé est ainsi incorporé dans l'ovocyte nouvellement fécondé sous forme d'un troisième pronucléus. Ce type de d'anomalie entraine donc la formation d'un zygote tripronucléé avec un seul globule polaire.

- Ovocyte géant diploïde

Les ovocytes géants sont des ovocytes anormaux, présentant généralement une vésicule germinative binucléée et un volume décrit comme étant 1,6 à 2 fois celui d'un ovocyte normal, selon les publications. Bien que ce mécanisme ait rarement été étudié en fécondation humaine, deux études récentes ont décrit ces ovocytes particuliers (Rosenbusch *et al.*, 2002, Balakier *et al.*, 2002). Ils ont ainsi démontré que deux populations d'ovocytes géants issus de deux modes de maturation permettent d'atteindre la métaphase II. Ces modes de maturation permettent, soit le maintien de la binucléation, à l'origine d'un ovocyte contenant deux noyaux haploïdes et deux premiers globules polaires haploïdes, soit la fusion des noyaux, donnant un ovocyte avec un noyau diploïde et un premier globule polaire haploïde. Ainsi, lors de la fécondation par un spermatozoïde haploïde, le processus de maturation avec maintien de la binucléation entrainera la formation d'un zygote tripronucléé avec expulsion de deux seconds globules polaires haploïdes. Dans l'autre cas de figure, cela conduira à la formation d'un zygote présentant un pronucléus paternel haploïde et un pronucléus maternel diploïde avec expulsion d'un second corps polaire diploïde, aboutissant à une cellule morphologiquement normale au vu du nombre de pronuclei. La présence d'ovocytes géants a été rapportée comme pouvant être en lien avec un taux d'œstradiol élevé lors de la stimulation ovarienne en vue d'une FIV (Balakier *et al.*, 2002).

1.2.2 Les zygotes monopronucléés

1.2.2.1 Activation parthénogénétique

La parthénogénèse correspond à l'activation de l'ovocyte sans l'action du spermatozoïde, en lien avec un stimulus extérieur qui provoque l'augmentation du calcium intracellulaire.
La présence d'un chromosome Y permet de distinguer les zygotes monopronucléés issus d'une activation parthénogénétique, des zygotes monopronucléés normalement fécondés.
L'incidence des zygotes à 1PN a été rapportée comme étant plus élevée après une procédure de FIV-ICSI, qu'après une FIV conventionnelle. Ainsi, les zygotes monopronucléés issus d'une FIV conventionnelle seraient généralement diploïdes, par asynchronisme d'apparition des pronuclei ou par fusion des pronuclei. A l'inverse, les zygotes monopronucléés issus d'une FIV-ICSI ont tendance à être secondaires à une activation parthénogénétique (Munné et Cohen, 1998).

1.2.2.2 Formation asynchrone des pronuclei

L'apparition asynchrone des pronuclei est un phénomène qui engendre un risque d'élimination d'un zygote qui serait en réalité bipronucléé et diploïde, mais considéré comme monopronucléé avec un risque d'aneuploïdie. Comme décrit ailleurs, cet asynchronisme peut être marqué par la formation et la disparition précoce d'un pronucléus entre 6 et 8 heures après l'insémination ou la microinjection du spermatozoïde, ou alors par une apparition retardée au-delà des vingt premières heures qui suivent la procédure de FIV dans une faible proportion des zygotes (Nagy *et al.*, 1994). Il est donc recommandé de renouveler l'observation des pronuclei à différentes heures afin de ne pas rater la formation d'un pronucléus précoce ou tardif (Staessen et Van Steirteghem, 1997). Ainsi, l'émergence des systèmes utilisant la technologie Time-Lapse®, permet de pallier à ces fenêtres d'observations manquantes du développement zygotique précoce (Payne *et al.*, 1997) et essentielles dans la sélection des embryons, grâce à un enregistrement continu du développement de la cellule-œuf, permettant de ne pas passer à côté de l'asynchronie d'apparition des pronuclei.

1.2.2.3 Fusion précoce des pronuclei maternel et paternel

L'union prématurée des pronuclei maternel et paternel en un pronucléus unique est décrite comme un mécanisme pouvant conduire à la formation des zygotes monopronucléés. Cela entraine la formation d'un zygote diploïde mais constitué d'un seul pronucléus avec généralement deux globules polaires (Mateo *et al.*, 2013). Néanmoins, dans une étude plus ancienne, Levron *et al.* (1995) évoquent l'altération de la plaque métaphasique lors de la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte comme cause de dysfonctionnement, conduisant à la mise en place d'une enveloppe pronucléaire commune et unique contenant le matériel chromosomique masculin et féminin, plutôt que la fusion des pronucléi en un pronucléus unique.

1.3 Les différents facteurs potentiellement impliqués dans la survenue d'une aneuploïdie au cours du développement embryonnaire

Lors de la fécondation, de nombreux facteurs sont impliqués pour contribuer au développement de l'embryon. Ces facteurs peuvent être intrinsèques, liés aux individus, ou alors extrinsèques, liés aux procédures clinico-biologiques des actes.

1.3.1 Les facteurs masculins

1.3.1.1 Altérations des paramètres spermatiques quantitatifs et qualitatifs

Les dégradations d'un ou de plusieurs paramètres spermatiques représentent un obstacle plus ou moins important aux capacités reproductives des individus. Ainsi, le recours à la FIV-ICSI est une échappatoire, offrant la possibilité d'une grossesse évolutive. Cependant, la performance de la technique ne permet pas de palier à l'existence préalable d'anomalies cytogénétiques spermatiques, couramment retrouvées devant des paramètres spermatiques altérés et conduisant potentiellement à l'injection de spermatozoïdes chromosomiquement

anormaux (Egozcue *et al.*, 2000). Ces anomalies correspondent en majorité à des aneuploïdies et sont marquées notamment par une augmentation des taux de diploïdie et de disomie autosomique et gonosomique, chez les patients atteints d'OATS comparés aux individus normozoospermiques (Pfeffer *et al.*, 1999 ; Calogero *et al.*, 2001). Ainsi, dans leurs études respectives Pfeffer *et al.* (1999) et Calogero *et al.* (2001), retrouvent un taux d'aneuploïdie spermatique totale (disomie et nullosomie des gonosomes et des autosomes) allant de 32% à 69% et de 1% à 9,73% dans les groupes OATS, et allant de 4,1% à 7,7% et de 0,3% à 1,18% dans les groupes témoins normozoospermiques. En outre, au sein de l'OATS, le degré de la tératozoospermie est un témoin clé de la présence d'une aneuploïdie spermatique, notamment en présence de spermatozoïdes macrocéphales avec des flagelles multiples, souvent en lien avec l'existence d'une diploïdie spermatique (Calogero *et al.*, 2003 ; Calogero *et al.*, 2001). Par ailleurs, au même titre que l'OATS, la présence d'une azoospermie obstructive ou non obstructive est également associée à des risques d'aneuploïdie spermatique. Il a été décrit que la survenue de ces aneuploïdies est due à des dysfonctionnements au cours de la ségrégation méiotique, et que plus l'atteinte spermatique est sévère, plus le risque d'anomalies chromosomiques des spermatozoïdes sera élevé. En 2002, Burrello *et al* soutiennent d'ailleurs que les prélèvements de spermatozoïdes testiculaires ou épididymaires sont plus à risque de contenir des aneuploïdies spermatiques, en retrouvant respectivement 23,65% et 9,85% de taux d'aneuploïdie spermatique totale pour ces prélèvements, contre un taux inférieur à 2% dans les prélèvements de sperme éjaculé. Cependant, ces anomalies chromosomiques peuvent survenir *de novo* au sein des cellules germinales, malgré un caryotype sanguin normal (Aran *et al.*, 1999).

Ainsi, il est légitime de s'interroger sur le statut chromosomique des embryons en devenir lors de la prise en charge de ces couples. Pourtant l'existence d'une corrélation entre le risque d'aneuploïdie embryonnaire et un statut spermatique altéré est sujette à controverse. Des travaux récents concluent que la présence de paramètres spermatiques défectueux même sévères, n'affecte pas la ploïdie embryonnaire au décours de la FIV-ICSI, bien que le taux de fécondation et celui de développement embryonnaire soient réduits chez ce type de patient, particulièrement en cas d'azoospermie non obstructive (Stein *et al.*, 2019 ; Mazzilli *et al.*, 2017).

A l'inverse de ces conclusions, Silber *et al.* (2003) ont retrouvé respectivement 26,5% et 53% d'embryons mosaïques en comparant les résultats d'analyses par FISH des embryons de FIV-ICSI issus de la fécondation soit par des spermatozoïdes éjaculés de patients oligospermiques, soit par des spermatozoïdes testiculaires provenant de patients atteints d'azoospermie non

obstructive sévère. Ils soutiennent donc, que l'utilisation de prélèvements de spermatozoïdes testiculaires de patients souffrant d'azoospermie non obstructive en FIV-ICSI, augmenterait l'incidence du nombre d'embryons porteurs de mosaïques chaotiques. Selon eux, cette anomalie serait plus en lien avec des anomalies du centriole spermatique affectant les premières divisions mitotiques, plutôt qu'avec l'aneuploïdie du spermatozoïde à proprement parler. Aboutissant à des constatations similaires, Magli *et al.* (2009), comparent quatre sous-groupes de patients, normozoospermiques, oligotératozooospermiques, atteints d'azoospermie non obstructive et d'azoospermie obstructive, et retrouvent pour chaque sous-groupe une incidence d'anomalies chromosomiques de 55%, 62%, 69% et 63% respectivement. Par ailleurs, ils recensent 95% de mosaïques chaotiques pour les embryons issus de patients atteints d'azoospermie non obstructive, alors que ce pourcentage est quasiment similaire à la proportion retrouvée pour les anomalies chromosomiques dans les autres sous-groupes. Ainsi, ils affirment que la présence de paramètres spermatiques sévèrement altérés, participe à la formation d'embryons avec une composition chromosomique anormale et que le risque de mosaïque est prédominant en cas d'azoospermie non obstructive. D'autres études sont en faveur d'une corrélation entre la présence d'anomalies chromosomiques spermatiques et le taux d'embryons aneuploïdes (Rodrigo *et al*, 2010 ; Kaarouch *et al*, 2015), en particulier lorsque le taux de disomies et de diploïdies spermatiques sont élevés (Rodrigo *et al*, 2010), ce qui est fréquent chez les patients présentant des paramètres de sperme altérés, comme évoqué précédemment. C'est le cas de Rodrigo *et al.* (2010), qui comparent la constitution chromosomique par PGS d'embryons obtenus après ICSI à partir des spermatozoïdes de trois groupes de patients. Ces patients étaient soit porteurs d'un caryotype sanguin normaux, soit d'un caryotype 47,XYY, et présentaient une infertilité masculine sévère avec des aneuploïdies spermatiques marquées notamment par une incidence élevée soit de disomies, soit de diploïdies des gonosomes pour les deux groupes à caryotype normaux, ou alors des deux types d'anomalies pour le groupe à caryotype 47,XYY. Dans chaque groupe, l'ensemble des embryons préimplantatoires analysés, présentait une augmentation significative des anomalies chromosomiques (supérieure à 58%) comparé au groupe témoin normozoospermique (34%). Par ailleurs, ils notent une corrélation entre la présence isolée d'une diploïdie ou la présence d'un caryotype 47,XYY et l'augmentation du taux de triploïdie embryonnaire. Ainsi, la présence de disomies et de diploïdies spermatiques, participe à la formation de zygotes morphologiquement normaux, mais porteurs d'anomalies chromosomiques indétectables par l'observation du nombre de pronuclei.

1.3.1.2 Fragmentation de l'ADN spermatique et âge paternel

Le rôle majeur du spermatozoïde lors de la fécondation, consiste à transmettre une copie haploïde du génome paternel, afin de reconstituer, avec le composant haploïde maternel, une cellule-oeuf diploïde. Au sein du spermatozoïde, le génome paternel est compacté grâce à la présence de protamines, cette forme assurant la protection du patrimoine génétique masculin de tout facteur potentiellement délétère pour l'ADN. Les altérations de l'ADN spermatique, peuvent survenir lors de modifications anormales de la configuration de la chromatine, lors d'un compactage inadéquat de l'ADN, ou être provoquées par la présence d'agents nocifs extérieurs tels que des facteurs environnementaux, la radiothérapie ou la présence d'espèces réactives à l'oxygène à l'origine d'un stress oxydatif au cours du transport des gamètes à travers le tractus génital masculin ou féminin. Ces dommages de l'ADN se traduisent par une fragmentation de l'ADN sous forme de cassures, double ou simple brin (Colaco et Sakkas, 2018). La présence de fragmentation de l'ADN spermatique est fréquente chez les hommes présentant des paramètres de sperme défectueux (Sakkas *et al.*, 2002), et plus particulièrement dans le groupe d'hommes atteint de tératozoospermie avec une prédominance des anomalies de la tête du spermatozoïde comme le détaillent Brahem *et al.*, en 2011. Dans cette dernière étude, les auteurs analysent le taux de fragmentation de l'ADN spermatique de patients atteints d'une tératozoospermie isolée comparé à des sujets normozoospermiques, grâce au test TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling). Au sein du groupe atteint de tératozoospermie isolée, ils notent d'une part, une augmentation significative de l'incidence des anomalies de la tête spermatique par rapport au groupe d'hommes normozoospermiques ($p < 0,05$), avec une prépondérance des anomalies céphaliques de type têtes amorphes, allongées et microcéphaliques. D'autre part, ils retrouvent une corrélation significative entre le taux élevé de fragmentation de l'ADN spermatique et l'augmentation de l'incidence des spermatozoïdes macrocéphales chez les patients tératozoospermiques ($r = 0,402$, $p < 0,01$). Il a également été constaté une incidence plus élevée d'aneuploïdie spermatique et de fragmentation de l'ADN chez les patients présentant une tératozoospermie isolée, par rapport aux sujets normozoospermiques (Brahem *et al.*, 2011 ; Tang *et al.*, 2010).

Par ailleurs, l'effet de l'âge paternel avancé sur l'augmentation du taux de fragmentation de l'ADN a été constaté par plusieurs études (Garcia Ferreyra *et al.*, 2012 ; Vagnini *et al.*, 2007). Cependant, malgré la prévalence de dommage de l'ADN chez les hommes présentant des paramètres spermatiques altérés ou d'un âge avancé, la présence de dommages de l'ADN

spermatique ne semble pas être associée à une augmentation de l'incidence des anomalies chromosomiques chez l'embryon préimplantatoire dans la plupart des travaux menés sur le sujet, à l'exemple des travaux de Gat *et al.*, en 2017. Ces derniers n'ont retrouvé aucune corrélation significative entre un indice de fragmentation de l'ADN spermatique élevé et l'augmentation du taux d'aneuploïdie embryonnaire après évaluation des blastomères issus de blastocystes par PGS, et ce même au sein du groupe d'hommes plus âgés (moyenne de 45,1 ans) comparé aux deux autres groupes constitués d'hommes dont la moyenne d'âge était de 40,6 et 38,3 ans. Les caractéristiques maternelles telles que l'âge ou la réserve ovarienne étaient comparables dans les trois groupes et le pourcentage de blastocystes euploïdes s'est avéré similaire. Seule une étude menée en 2015 (Garcia Ferreyra *et al.*), en tenant compte des facteurs de confusion maternels, a mis en évidence en comparant des groupes d'hommes de tranches d'âge différentes (≤ 39 ans, 40 à 49 ans et ≥ 50 ans), une corrélation entre un taux élevé de fragmentation de l'ADN spermatique et l'aneuploïdie embryonnaire chez les hommes normozoospermiques, proportionnellement à l'avancée de l'âge paternel et notamment avec une incidence accrue au-delà de 50 ans (73,9% contre 59,1% et 61,1% dans les groupes ≤ 39 ans et 40-49 ans respectivement). En répartissant ainsi les résultats des analyses chromosomiques de 286 embryons effectuées par PGS selon l'âge paternel, ils constatent que les spermatozoïdes du groupe d'hommes plus âgés, ont un taux de fragmentation d'ADN plus élevé que les deux autres groupes et que cette tranche d'âge présente une tendance plus marquée de tératozoospermie par rapport à leurs semblables moins âgés.

1.3.2 Les facteurs féminins : aneuploïdie et âge maternel avancé

Depuis ces dernières années dans la société actuelle, les contraintes socio-économiques et professionnelles font que de plus en plus de femmes envisagent la maternité à un âge tardif. Cela entraine des risques de diminution de la réserve ovarienne et de la qualité ovocytaire à l'origine d'une augmentation des délais de conception, mais aussi des risques accrus d'avortements précoces ou d'anomalies fœtales (Schmidt *et al.*, 2012). Par ailleurs, contrairement aux hommes, au cours des procédures de FIV, l'implication de l'avancée de l'âge maternel (au-delà de 35 ans) dans la survenue des aneuploïdies embryonnaires, a été largement étudié et affirmé dans de nombreux travaux, avec pour cause principale des anomalies survenant au cours de l'ovogénèse (Cimadomo *et al.*, 2018 ; Eichenlaub-Ritter,

2013). L'avancement de l'âge maternel affecte l'ovocyte à différents niveaux, avec pour conséquence des répercussions sur la reproduction et le développement embryonnaire.

- Dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydatif :

Au sein de l'espèce humaine, comme dans la grande majorité des mammifères, les mitochondries sont d'origine maternelle (Sutovsky *et al.,* 1999). Les ovocytes des femmes d'âge avancé (âgées de plus de 35 ans) contiennent généralement des mitochondries sénescentes, porteuses de défauts structuraux tels que la vacuolisation, une atteinte des crêtes ou encore un gonflement mitochondrial, mais aussi des mutations de l'ADN mitochondrial plus fréquentes (Van Blerkom, 2011). L'altération de la fonction mitochondriale a été rapportée, chez cette catégorie de femme, comme un acteur potentiel de l'aneuploïdie embryonnaire, en raison d'une baisse de l'activité métabolique mitochondriale et d'une diminution de l'approvisionnement en ATP à l'origine de dysfonctionnements au niveau de l'appareil méiotique ou encore lors de la ségrégation des chromosomes (Cimadomo *et al.,* 2018 ; Eichenlaub-Ritter, 2013). En effet, la mise en repos des ovocytes lors de l'arrêt de la méiose en prophase I pendant une durée indéterminée chez la femme, est susceptible de favoriser, au fil des années, l'accumulation de composés toxiques pour les organites intra-cellulaires à l'instar de la mitochondrie. Cette exposition mitochondriale chronique au stress oxydatif chez la femme d'âge avancé, peut avoir des répercussions sur le fonctionnement méiotique, à l'origine d'aneuploïdies embryonnaires. En outre, l'accumulation potentiellement intensive et continue de ces composés toxiques, entraine une consommation inappropriée d'ATP au sein de l'ovocyte, ce qui réduit la quantité d'ATP ovocytaire disponible, mais va aussi impacter l'équilibre d'autres éléments intracellulaires indispensables au fonctionnement normal de l'ovocyte, tels que le calcium et le glutathion. L'altération des fonctions mitochondriales engendrée par le stress oxydatif entraine des perturbations non seulement au niveau de la structure du fuseau méiotique mais aussi sur le développement embryonnaire (Tarin, 1996 ; Zhang, 2006).

Cependant, les dysfonctionnements mitochondriaux liés à l'âge pourraient être réversibles, grâce à un mode de vie hygiéno-diététique sain basé sur la pratique d'exercice physique et la consommation d'aliments anti-oxydants entre autres (Eichenlaub-Ritter, 2013).

- Raccourcissement des télomères :

Les télomères sont des séquences répétées de l'ADN de petite taille et en tandem situés aux extrémités des chromosomes. Ils ont une place capitale dans la stabilité des chromosomes et notamment dans l'étape d'appariement des chromosomes homologues, facilitant les recombinaisons au cours de la méiose (Keefe, 2007). L'avancée en âge de la femme est également associée à une réduction de la longueur des télomères au sein des ovocytes, en réponse à un stress oxydatif ou alors à l'issue d'une division cellulaire (Kalmbach, 2013). Or, le raccourcissement des télomères se traduit par un déficit en ADN télomérique, pouvant participer au défaut de ségrégation chromosomique au cours de la méiose et donc aboutir à une aneuploïdie embryonnaire. (Kalmbach, 2013 ; Treff 2011). Par ailleurs, la réduction de la longueur des télomères semble affecter principalement l'embryon au stade de clivage, mais n'a pas d'impact sur la ploïdie au stade blastocyste, en raison de l'allongement des télomères survenant entre ces deux stades de développement (Treff 2011).

- Altération de la cohésion des chromosomes et erreur de ségrégation méiotique :

Parmi les fonctions potentiellement altérées par l'avancée de l'âge maternel, le défaut de cohésion entre les chromosomes homologues ou les chromatides-sœurs, est un élément central évoqué dans plusieurs travaux portant sur les origines de l'aneuploïdie embryonnaire (Revenkova *et al.,* 2004 ; Revenkova *et al.,* 2010 ; Jessberger, 2012 ; Cheng et Liu, 2017). Cette cohésion chromosomique est assurée par la cohésine, un complexe formé par différentes structures protéiques : les protéines Smc1β et Smc3 qui forment ensemble une structure en V, dont les extrémités ouvertes sont reliées par la protéine Rec8 associée à la protéine Stag3 (Cheng et Liu, 2017). Cette configuration permet à la cohésine de maintenir le contact entre les centromères et les bras chromosomiques des chromosomes homologues avant l'anaphase, évitant la ségrégation anarchique des chromosomes au cours de la méiose. Ainsi, dans les ovocytes arrêtés en prophase I, la reprise de la méiose se caractérise par un clivage de la cohésine des bras chromosomiques à l'anaphase I, permettant la ségrégation équilibrée des chromosomes de chaque paire. Puis, lors de l'anaphase II, la cohésine centromérique sera à

son tour libérée pour permettre la répartition des chromatides sœurs, assurant la formation d'une cellule-fille haploïde (Jessberger, 2012).

Le fait que les composants protéiques du complexe de la cohésine soient au centre des mécanismes impliqués dans le déroulement de la ségrégation et la répartition adaptée des chromosomes, soulève la possibilité que l'altération ou l'absence de certaines de ces molécules soit à l'origine de l'augmentation de l'aneuploïdie embryonnaire liée l'âge maternel. La grande majorité des travaux menés sur le complexe de la cohésine et ses composants, ont été effectués sur des modèles murins, mais les similitudes dans le déroulement de la méiose humaine, permettent de transposer les résultats à l'Homme.

Ainsi, en 2004, Revenkova *et al.*, comparent des souris porteuses d'une seul copie du gène codant pour Smc1β, appelées Smc1β $^{+/-}$, et des souris totalement dépourvues du gène, appelées Smc1β$^{-/-}$, et démontrent que seules les souris n'exprimant pas Smc1β sont stériles, alors que leurs congénères monogéniques ont une fertilité normale. Par ailleurs, ils constatent que les ovocytes des souris Smc1β$^{-/-}$ sont pourtant capables de poursuivre la méiose jusqu'en métaphase II, mais que celle-ci est défectueuse, marquée par une augmentation des univalents et une perte de bivalents en lien avec des défauts de cohésion chromatidiques et donc responsables d'aneuploïdies importantes. L'autre point intéressant de cette étude est la mise en lumière de l'implication probable de Smc1β dans le maintien des chiasmas, zones de recombinaison entre les chromatides des chromosomes homologues, sous-entendant que son absence ou son altération pourrait expliquer la perte de ces chiasmas par défaut ou réduction de la cohésion entre les chromosomes. Ces deux derniers points ont été rapportés à l'avancée de l'âge maternel, qui accentuerait le phénomène de perte prématurée des chiasmas par diminution de la cohésion entre les chromatides sœurs (Revenkova *et al.*, 2004). En effet, la perte des chiasmas serait le résultat d'un glissement progressif de ces points de recombinaisons homologues au fur et à mesure du vieillissement ovocytaire, entrainant donc une séparation prématurée des chromatides (Revenkova *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'utilisation de souris dont le déficit en Smc1β n'est induit qu'après la naissance, démontre que la protéine Smc1β n'est présente que durant la prophase I chez le fœtus, mais n'est pas renouvelée après la naissance. Son taux décroit donc avec l'âge et est probablement existant dans des proportions très réduites chez la femme d'âge avancé. Pourtant, sa régénération au cours de la vie d'un individu, ne semble pas nécessaire pour maintenir une cohésion optimale des chromatides sœurs, car aucun impact sur la fertilité, ni aucune augmentation des anomalies liées à la position ou à la perte prématurée des chiasmas n'a été relevé chez ces souris

déficientes en Smc1β après la naissance, et ce, même chez les souris âgées. Ceci suggère que la protéine Smc1β, bien que nécessaire au maintien de la cohésion entre les chromatides, tient un rôle essentiel principalement au cours de la période fœtale, jusqu'à l'arrêt en Prophase I, puis son implication après le stade de follicule primordial n'est pas nécessaire pour garantir une cohésion entre les chromosomes. Ainsi, la perte prématurée de cohésion entre les chromatides ne semble pas être directement en rapport avec une diminution du taux de Smc1β avec l'avancée en âge, mais plus en lien avec une détérioration de la cohésion chromosomique mis en place par Smc1β lors de la phase précoce de la méiose (Revenkova *et al.*, 2010).

Autre protéine du complexe de la cohésine, la protéine Rec8 est au même titre que Smc1β spécifique de la méiose et peut être impliquée dans les erreurs de ségrégation liées à l'âge. Il a d'ailleurs été constaté, lors d'une étude sur des modèles murins, qu'un niveau seuil de Rec8 était nécessaire pour prévenir la survenue d'erreur de ségrégation, et qu'en-dessous de ce seuil, généralement atteint chez les ovocytes de souris âgées, un nombre accru d'aneuploïdies était observé. De plus, la diminution de Rec8 au sein des ovocytes de souris âgées était aussi corrélée à l'augmentation de la distance inter-kinetochores des chromatides, ce qui est en faveur d'une diminution de la cohésion et conforte les constatations concernant l'augmentation des erreurs de ségrégation chromosomiques (Chiang, 2010).
Par ailleurs, dans des travaux portant sur l'étude de la ségrégation chromosomique méiotique de la levure de fission en 1999 (Watanabe et Nurse), il a été démontré que la protéine Rec8 semble jouer un rôle dans le déroulement normal de la ségrégation réductionnelle des chromosomes à l'issue des divisions méiotiques. En effet, Rec8 assure d'une part le maintien de la cohésion centromérique des chromatides sœurs, évitant ainsi la séparation prématurée des chromatides, et d'autre part en dirige de façon adaptée l'orientation des kinetochores pour permettre le déplacement correct des chromosomes à chaque étape de la ségrégation.

1.3.3 Les facteurs liés à la procédure technique de FIV-ICSI

L'ICSI et le devenir des patients dont l'infertilité était d'origine masculine. Cependant, contrairement à la FIV conventionnelle où la fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde tente de reproduire *in vitro* le mécanisme de conception *in vivo*, la FIV-ICSI implique des manipulations humaines tout au long de la procédure. La sélection du spermatozoïde à

injecter se fait de manière aléatoire selon des critères morphologiques et de motilité spermatique dépendants de l'appréciation du manipulateur. De ce fait, le processus de sélection naturelle et les mécanismes ovocytaires permettant de bloquer la fécondation de l'ovocyte par un spermatozoïde anormal sont court-circuités, augmentant le risque de transmissions d'anomalies chromosomiques à l'embryon. Les barrières levées grâce à la FIV-ICSI, ont donc fait émerger des interrogations quant à l'impact éventuel sur l'embryon et notamment sur son statut chromosomique. Ces interrogations sont d'autant plus légitimes que les couples amenés à avoir recours à la FIV-ICSI présentent des infertilités d'origine masculine dont la sévérité varie et dont l'importance de l'atteinte spermatique quantitative et/ou qualitative est souvent associée à des anomalies cytogénétiques préalablement acquises, comme discuté précédemment (Calogero *et al.,* 2003).

Ainsi, la zone pellucide, premier barrage ovocytaire pour la filtration des spermatozoïdes lors de la conception physiologique, a été décrite en plus comme un garde-fou essentiel dans la restriction du risque de fécondation par un gamète mâle aneuploïde. En effet, dans leur étude, Van Dyk *et al.,* (2000) ont démontré que la zone pellucide était capable de faire un tri sélectif entre les spermatozoïdes sans anomalies de nombre de chromosomes et les spermatozoïdes présentant une aneuploïdie. Le contournement du contrôle exercé par la zone pellucide lors de l'injection directe du spermatozoïde dans l'ovocyte au cours de la FIV-ICSI, pourrait donc favoriser la formation d'embryons aneuploïdes.

De plus, les conditions de réalisation de la FIV-ICSI sont essentielles au bon déroulement et à l'issue de la procédure. L'impact potentiel de la micromanipulation des ovocytes sur le cytosquelette de la cellule et les répercussions cytogénétiques probables ont d'ailleurs été rapportés par Macas *et al.,* en 1996. Ces derniers ont mis l'accent sur des anomalies affectant la deuxième division méiotique ovocytaire, provoquées par la modification de la pression hydrostatique intracellulaire survenant lors de l'aspiration de la membrane plasmique par la micropipette d'injection, ou encore la concentration inappropriée d'ion calcium dans le milieu, responsables éventuels de la malségrégation chromosomique à l'origine des zygotes multipronucléés aneuploïdes au décours de la FIV-ICSI.

Par ailleurs, une décoronisation « délicate » de l'ovocyte est également un élément clé d'une microinjection réussie. En effet, des gestes d'aspiration-refoulement trop intenses pourraient entrainer un éloignement du fuseau méiotique du premier corps polaire. Or, celui-ci est utilisé comme point de repère de l'emplacement du fuseau lors l'injection du spermatozoïde. Cela engendrerait donc un risque de lésion du fuseau méiotique par l'aiguille d'injection, mais aussi un risque de perturbation du système microtubullaire provoquée par la présence inadaptée

d'ion calcium à proximité d'un fuseau méiotique de localisation hasardeuse (Macas *et al.*, 1996).

1.3.4 Les facteurs liés à la stimulation hormonale et au rendement ovocytaire

Au cours de la prise en charge en AMP, la stimulation ovarienne s'effectue à l'aide de gonadotrophines exogènes dans le but d'obtenir d'une réponse ovarienne optimale. Le nombre et la taille des follicules souhaités vont dépendre de la qualité de cette réponse ovarienne et celle-ci déterminera ainsi le nombre d'ovocytes obtenus à l'issue de la ponction folliculaire. Dans le cadre de la FIV en général, l'objectif est de mettre en place une hyperstimulation ovarienne contrôlée à l'aide des gonadotrophines et d'obtenir une maturation multifolliculaire, permettant la croissance d'un nombre jugé suffisant de follicules antraux avant de provoquer le déclenchement de l'ovulation. La durée et le type de stimulation ovarienne diffèrent selon le type de protocole de stimulation choisi, celui-ci dépendant d'une part du centre d'AMP, mais aussi des caractéristiques clinico-biologiques de la patiente, telles que sa réserve ovarienne, le risque de Syndrome d'Hyperstimulation Ovarienne (SHO) ou ses antécédents de réponse à la stimulation (Alper et Fauser, 2017).

Ainsi, la dose de gonadotrophines exogènes administrées et la relation avec l'aneuploïdie embryonnaire, a fait l'objet de travaux dont les résultats divergent. Certains soutiennent qu'une stimulation ovarienne utilisant de faibles doses de gonadotrophines permettrait d'obtenir une diminution significative du taux d'aneuploïdie, avec un nombre d'ovocytes recueillis plus faible. (Baart *et al.*, 2007). D'ailleurs, une hyperstimulation ovarienne provoquant une réponse ovarienne élevée et un rendement ovocytaire important, semblerait favoriser la survenue d'anomalies chromosomiques ovocytaires, en comparaison aux patientes dont le nombre d'ovocytes récupérés serait plus faible, et ce, malgré un protocole de stimulation similaire (Haaf *et al.*, 2009). A l'inverse de ces constations, l'analyse de cohorte rétrospective de Sekhon *et al.*, en 2017, concluent que la dose de gonadotrophines n'a aucun impact sur l'incidence de l'aneuploïdie embryonnaire chez les patientes nécessitant une stimulation ne dépassant pas 12 jours, caractérisées comme étant des répondeuses normales. En revanche, chez les patientes dont la réponse à la stimulation ovarienne était faible au douzième jour et qui nécessitaient une stimulation prolongée avec une dose cumulée de gonadotrophines plus

importante, il existait une corrélation significative entre le nombre d'embryons aneuploïdes et la dose de gonadotrophines administrée.

1.4 Différence de taille des pronuclei : retentissement sur l'embryon et facteurs favorisants ce dysmorphisme

L'observation de différences de taille entre le pronucléus maternel et le pronucléus paternel, pourrait être un indicateur de la qualité embryonnaire, pouvant être utilisé comme un outil non invasif dans la sélection de l'embryon à transférer.

1.4.1 Diamètre pronucléaire : normalité et limites biométriques

L'apparition des pronuclei peut se faire entre 6h et 20h après la fécondation (Nagy *et al.*, 1994). Dès lors, le zygote est considéré comme normalement fécondé en présence de deux pronuclei et de deux globules polaires dans l'espace péri-vitellin, témoignage de la transmission correcte du patrimoine génétique issu de chaque parent (Rosenbusch, 2008). Le diamètre des pronuclei présente des caractéristiques propres à chaque espèce. Au sein de l'espèce humaine, leur taille n'est pas clairement définie dans la littérature, mais celle-ci semble être similaire ou du moins la différence existante est insignifiante chez les zygotes monospermiques bi-pronucléés, rendant donc impossible la distinction entre le pronucléus maternel et paternel (Malter et Cohen, 1989 ; Wiker et al, 1990).
En conséquence, l'existence d'un dysmorphisme entre les pronoyaux fait émerger des interrogations concernant l'impact de ces différences biométriques sur l'embryon, y compris chez les embryons issus de zygotes bipronucléés considérés comme normalement fécondés.

Des différences de diamètres supérieures à 4µm entre les deux pronuclei ont d'ailleurs été corrélées à une augmentation des arrêts de développement des embryons en clivage, mais aussi à une proportion plus élevée de mosaïcisme au sein de ce groupe de zygotes par rapport aux zygotes présentant des pronuclei de taille comparable (Sadowy et al, 1998). En outre, les différences de taille des pronuclei et leur implication potentielle sur la qualité de l'embryon en devenir, ont conduit à l'élaboration de systèmes de notation visant à évaluer la morphologie

pronucléaire afin de prédire le développement embryonnaire. Sur la base de ces scores pronucléaires, des travaux mettent en évidence une diminution du taux de développement en blastocyste en présence d'un dysmorphisme (Zollner et al, 2002). De même, dans leurs travaux menés en 2003, Nagy *et al.*, démontrent que la taille similaire ou non des pronuclei affecte le développement embryonnaire et que les zygotes dont les pronuclei sont inégaux ont tendance à avoir une cinétique de clivage plus lente et une qualité embryonnaire diminuée.
Ces données mises en évidence chez les zygotes bipronucléés, sont en parties retrouvées chez les zygotes tripronucléés présentant deux pronuclei de taille similaire et un plus petit pronucléus. En effet, pour ces derniers, il a également été constatée une augmentation significative de la probabilité d'arrêt de clivage embryonnaire à un stade précoce. Cependant, à contrario, la ploïdie ne semble pas être affectée par la présence d'un pronucléus de taille inégale aux deux autres, une majorité de ces zygotes s'avérant être diploïdes. De même, le taux de blastulation n'était pas particulièrement compromis dans ce groupe de zygotes (Capalbo et al, 2017).

1.4.2 Facteurs favorisants la survenue d'une inégalité de taille entre les pronuclei

1.4.2.1 Rôle du vieillissement ovocytaire post-maturation lors de l'ICSI

Au cours de la FIV-ICSI, la maturité des ovocytes avant l'injection de spermatozoïde est un élément clé du succès de la procédure. Ainsi, il a été décrit qu'une période d'incubation pré-ICSI de 2 à 4 heures après l'étape de décoronisation des ovocytes, permettait d'accroître le taux de fécondation et d'améliorer la qualité embryonnaire, mais aussi d'optimiser la maturité ovocytaire en vue de l'injection (Isiklar et *al.*, 2004). A l'inverse, d'autres études soutiennent que la période d'incubation avant l'injection du spermatozoïde n'a aucun impact sur le taux de fécondation ou la qualité embryonnaire, à l'exemple de Jacobs *et al.* (2001), qui ne retrouvent aucune différence significative pour ces paramètres sur les résultats de FIV-ICSI pour quatre sous-groupes répartis selon la période de préincubation avant la microinjection pouvant s'étaler de 0,5 à 8 heures. Toutefois, quelle que soit la durée de l'incubation avant l'injection, les ovocytes récupérés dans le liquide de ponction présentent parfois une immaturité ovocytaire marquée par la présence d'une vésicule germinative. A ce stade l'ovocyte ne peut être fécondé et sera soit éliminé, soit inclus dans la procédure de FIV-ICSI

s'il est apte à atteindre la maturité *in vitro* en expulsant son premier globule polaire, témoin du passage en métaphase II (Holubcová *et al.*, 2019).

En outre, le délai entre la maturation ovocytaire *in vitro* et le moment de l'injection du spermatozoïde ne doit pas dépasser une fenêtre temporelle durant laquelle la fécondation est considérée comme optimale. Au-delà de ce délai, l'ovocyte subit un vieillisement post-maturation, qui impactera la qualité ovocytaire et par conséquent la qualité embryonnaire, mais va aussi accroître le risque d'activation parthénogénétique et donc de formation de zygote à 1PN. Ce vieillissement ovocytaire post-maturation serait en outre à l'origine d'une augmentation de l'incidence des dysmorphismes pronucléaires, affectant principalement le pronucléus paternel dont le diamètre serait diminué de plus de 3,5µm par rapport aux pronucléus maternel, à l'issue de la fécondation d'un ovocyte post-mature. (Goud *et al.*, 1999) Ainsi, le développement pronucléaire est tributaire du temps d'incubation des ovocytes, dont le délai avant l'injection par le spermatozoïde doit être parfaitement adapté, afin d'éviter les conséquences néfastes éventuelles sur l'embryon en devenir.

1.4.2.2 Altération du processus de décondensation chromatinienne spermatique et rôle du glutathion

Au sein de l'ovocyte, le facteur de décondensation joue un rôle primordial dans le processus de décompaction de la chromatine spermatique. En effet, afin d'assurer l'intégrité du génome paternel, la chromatine est fortement compactée au sein du noyau spermatique par le biais des protamines. Après la fécondation, pour permettre la séparation adéquate des chromosomes parentaux au moment de la mitose embryonnaire, il est indispensable que le génome paternel soit accessible et donc que la chromatine soit relâchée, grâce entre autres, à l'élimination des protamines (Clift et Schuh, 2013), mais aussi à la réduction des liaisons disulfures qui assurent le compactage de la chromatine au sein du noyau spermatique (Perreault *et al.*, 1984). Ces évènements essentiels à la poursuite des divisions mitotiques et au bon développement du pronucléus paternel, sont liés au facteur de décondensation ovocytaire. Le déroulement de la décompaction du noyau spermatique implique la présence de glutathion ovocytaire, produit par l'ovocyte au cours de sa maturation et qui est non seulement un acteur majeur de la réduction des ponts disulfures, mais joue aussi un rôle dans la libération du

centriole spermatique, pièce essentielle pour la mise en place du centrosome zygotique (Sutovsky et Schatten, 1997).

Ainsi, un dysfonctionnement du facteur de décondensation peut être plus fréquent dans les ovocytes ayant subi un vieillissement post-maturation. Or, une altération de ce facteur pourrait expliquer la corrélation entre la réduction du diamètre pronucléaire touchant majoritairement le pronucléus paternel et le vieillissement ovocytaire post-maturation, en raison d'une décompaction inadaptée de la chromatine spermatique. De même, une quantité insuffisante de glutathion ovocytaire au sein des ovocytes post-matures, favoriserait le défaut de croissance du pronucléus masculin (Goud et al., 1999).

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Population de l'étude

Les travaux ont été menés entre décembre 2018 et mars 2019 au service de Biologie de la Reproduction-CECOS de l'hôpital Pellegrin (CHU de Bordeaux).
Trente-neuf zygotes provenant de vingt-trois couples soumis à une procédure de FIV-ICSI ont été évalués.

2.1.1 Critères d'inclusion

Tous les zygotes observés, issus de procédures de FIV-ICSI présentant, pendant la période de l'étude, un seul pronucléus ou plus de deux pronuclei ont été inclus, quels que soient l'origine des gamètes, le rang de la tentative ou l'âge des patientes.
Ont été inclus également les zygotes bloqués à deux pronucléi à 48 heures post recueil ovocytaire, issus d'une même cohorte ovocytaire d'une patiente.

2.1.2 Critères d'exclusion

Afin d'éliminer la polyspermie comme cause d'aneuploïdie, les zygotes issus de tentative de FIV conventionnelle, ont été systématiquement exclus de notre étude.
Les zygotes dont les pronuclei n'étaient plus visibles au moment de l'observation n'ont pas été inclus, tout comme ceux ayant commencé à se cliver.

2.1.3 Consentements des patients

Les couples dont les zygotes ont été inclus dans la recherche avaient préalablement signé un consentement pré FIV où est mentionnée la possibilité d'utilisation des gamètes et zygotes destinés au rebut, à des fins de recherche.

2.2 Protocole de FIV-ICSI au laboratoire de FIV du CHU de Bordeaux

Toutes les patientes subissaient une stimulation ovarienne par protocole antagoniste ou long agoniste associé à un déclenchement de l'ovulation par injection de hCG ou d'agoniste de la GnRH.

Le recueil de sperme frais se faisait le matin de la ponction, par masturbation après entre 2 à 5 jours d'abstinence sexuelle. Le sperme était préparé par la technique de gradient de densité ou par la technique de lavage centrifugation, puis placé dans l'étuve à 37°C sous 5% de CO_2 jusqu'au moment de la microinjection. Les spermatozoïdes issus de don ou d'origine épididymaire ou testiculaire, étaient cryoconservés de façon asynchrone et les paillettes étaient décongelées le jour de la ponction.

La ponction folliculaire avait lieu 36 heures après le déclenchement au bloc opératoire et la recherche des complexes cumulo-ovocytaires se faisait dès réception des prélèvements par un technicien. Les cellules du cumulus et de la corona radiata étaient éliminées grâce à l'action enzymatique de la Hyaluronidase (27UI/ml au final) (Irvine Scientific, France), puis mécaniquement par aspiration-refoulement à l'aide d'un capillaire stérile de 125 µm de diamètre. La maturité des ovocytes dénudés était évaluée par la présence d'un premier globule polaire. Les ovocytes matures étaient ensuite microinjectés en moyenne 3 heures après la ponction, puis mis en culture dans le milieu unique Global®- HSA recouvert d'huile OVOIL® et placés dans les incubateurs.

2.3 Observation, sélection et vitrification des zygotes

2.3.1 Observation et sélection

La fécondation des ovocytes était observée entre 16 à 22h après la FIV-ICSI. Les ovocytes fécondés étaient cultivés soit dans l'Embryoscope™, soit dans l'incubateur de paillasse multichambre K-System G185™, selon l'organisation du laboratoire et la disponibilité journalière des emplacements au sein des incubateurs.

Lorsque la culture se faisait dans l'Embryoscope™, nous avons effectué l'observation nous-même, contrôlée par un biologiste, grâce à l'analyse des séquences Time Lapse®.

Lorsque la culture se faisait dans le K-System G185™, l'observation s'effectuait au microscope inversé, par un technicien ou un biologiste.

Les zygotes présentant deux pronuclei et deux globules polaires étaient considérés comme normalement fécondés. Tous les zygotes possédant une anomalie du nombre de pronucléus étaient sélectionnés pour notre étude.

Un zygote était considéré comme étant monopronucléé, s'il possédait un pronucléus unique, quelle que soit sa taille et était identifié 1PN. Afin de nous assurer de l'absence de survenue d'un deuxième pronucléus, l'observation des zygotes 1PN était répétée à différents moments jusqu'à maximum 22 heures post-microinjection avant de l'inclure dans notre étude.
Ils étaient jugés tripronucléés lorsqu'ils possédaient, soit trois noyaux de taille identique, soit deux noyaux de taille similaire associés à un plus petit noyau, dont la taille devait être inférieure d'au moins un tiers de celle des deux autres. Afin de les différencier, nous les avons nommés 3 PN et 2+1PN respectivement.
Enfin, un zygote polypronucléé était défini comme possédant plus de trois pronucléi, quelle que soit leur taille.

2.3.2 Vitrification

Pour des raisons pratiques, nous avons dû vitrifier l'ensemble des zygotes sélectionnés afin de les traiter en même temps par la suite. Chaque zygote inclus, était vitrifié le jour même de sa sélection, en utilisant le kit de vitrification de Irvine Scientific (Vit Freeze®-Kit, Irvine Scientific, France) et en suivant le protocole établi par le fournisseur. Les paillettes (HSV®, Cryobiosystem, France) étaient ensuite conservées au CECOS dans un canister identifié dans l'azote liquide à -196°C.

2.4 Fixation des zygotes et FISH

La fixation des zygotes ainsi que la technique FISH étaient réalisées au laboratoire de Biologie de la Reproduction et de cytogénétique du CHU d'Amiens, grâce à la contribution du Professeur Benkhalifa.

2.4.1 Choc hypotonique et dégradation de la zone pellucide

Les paillettes étaient dévitrifiées une par une, en utilisant le kit de dévitrification de Irvine Scientific® (Vit Kit®-Thaw, Irvine Scientific, France), en suivant le procédé technique établi

par le fournisseur. Les zygotes dévitrifiés étaient exposés à 100µL d'une solution de lyse (composition établie par le Professeur Benkhalifa), sous contrôle microscopique, pendant 5 à 10 minutes maximum, afin de créer un choc hypotonique qui permettait de rompre la zone pellucide. Ainsi, lorsque la cellule était d'apparence claire et que la zone pellucide semblait avoir disparue, le zygote était récupéré à l'aide d'un capillaire stérile et déposé, avec le plus petit volume de liquide possible, sur une lame dégraissée, où un spot avait été au préalable gravé afin de faciliter la recherche des noyaux au microscope après l'hybridation.

2.4.2 Fixation à l'acide acétique/méthanol et déshydratation

Afin de fixer les noyaux et permettre l'étalement des chromosomes, une goutte de solution de fixation méthanol/acide acétique (2 :1) était ajoutée au niveau du spot. Jusqu'à 3 gouttes de cette solution étaient additionnées à chaque fois que le spot s'asséchait, puis, nous avons achevé la fixation en ajoutant des gouttes de solution méthanol/acide acétique (3:1), jusqu'à ce que le cytoplasme soit lysé et que les chromosomes soient brièvement visibles sous forme de petits bourgeons foncés. Puis les lames étaient laissées à sécher sur une platine chauffante. Dans le but de ne pas perdre les noyaux de vue et d'assurer leur présence dans la zone délimitée sur la lame, l'ensemble de cette étape était effectué sous contrôle microscopique.
Enfin, la déshydratation des prélèvements était effectuée en plongeant les lames successivement dans des bacs d'éthanol à différentes concentrations croissantes (70%, 85% et 100%) pendant 2 minutes chacun, sauf dans le dernier bac dans lequel les lames devaient rester pendant 4 minutes. Avant de débuter l'hybridation, les lames devaient être complètement sèches.

2.4.3 Réalisation de la technique FISH au laboratoire de cytogénétique du CHU d'Amiens

Suite à l'étape de déshydratation, les lames étaient traitées dans une pièce à l'abri de la lumière pour être hybridées. Pour apprécier la ploïdie des zygotes pour les chromosomes X, Y et 18, nous avons utilisé le coffret commercial Aneuvysion® (Abbott, Etats-Unis), contenant

un mélange de sondes à ADN centromérique spécifiques du chromosome X (CEP X SpectrumGreen™, Xp11.1-Q11.1), du chromosome Y (CEP Y SpectrumOrange™, Yp11.1-Q11.1) et du chromosome 18 (CEP 18 SpectrumAqua™,18p11 .1-q11.1). Ainsi, 3µL de solution contenant le mélange de sondes à ADN spécifiques étaient déposés au niveau des zones ciblées sur chaque lame, qui étaient ensuite recouvertes par une lamelle et placées dans la chambre humide de l'automate (ThermoBrite Slide Denaturation/Hybridization System®, Abbott) qui réalise le programme d'hybridation pendant deux heures. Durant cette étape, l'ADN cible et la sonde étaient dénaturés à une température de 73°C pendant deux minutes, suivie d'une phase d'hybridation à 37°C. Une fois le cycle d'hybridation achevé, les lamelles étaient retirées délicatement. Ensuite, afin d'éliminer les sondes non liées, les lames étaient lavées au bain marie à 73°C dans une solution de lavage (0.4x SSC/ 0.3% NP 40) puis dans une solution de lavage de concentration différente (2x SSC/ 0.1% NP40) à température ambiante, pendant deux minutes chacun. Enfin, les lames étaient plongées dans des bacs d'éthanol à 70,85 et 100% pendant deux minutes successivement et une fois sèches, 5 à 10µL de 4,6- diamino- 2- phenylindole dihydrochloride (DAPI, Aneuvysion, Abbott®, Etats-Unis) étaient appliqués au niveau de chaque spot afin d'identifier les noyaux grâce à une contre-coloration. Les lames étaient ensuite mises à 4°C dans une boite à l'abri de la lumière pendant 20 minutes après avoir été recouvertes d'une lamelle.

2.5 Lecture des lames

La lecture des lames était effectuée avec un microscope à épifluorescence en utilisant un filtre approprié pour la visualisation des sondes utilisées et à l'aide du système d'imagerie microscopique automatisé Metasystem® pour l'évaluation de la ploïdie. Une lame d'un blastocyste était utilisée comme contrôle interne afin de vérifier l'efficacité de l'hybridation.
Pour être cohérent avec l'évaluation morphologique, un zygote monopronucléé devait être haploïde et présenter un seul signal fluorescent pour les chromosomes X ou Y et un seul signal pour le chromosome 18. De même, un zygote tripronucléé était censé être triploïde et présenter trois signaux d'hybridation pour chacun des chromosomes testés.

3. RESULTATS

3.1 Population analysée

Après évaluation du nombre de pronucléus à J1, tous les zygotes présentant moins ou plus de deux pronuclei ont été inclus. Ainsi, nous avons vitrifié trente-neuf zygotes parmi lesquels 38% (15/39) de zygotes 1PN, 44% (17/39) de zygotes tripronucléés et 18% (7/39) de zygotes polypronucléés (2/7) ou bloqués à 2PN (5/7) après deux jours de développement. A l'issue de l'étape de choc hypotonique, quatorze zygotes étaient lysés et vingt-cinq ont pu être analysés par FISH. Sur les vingt-cinq zygotes traités par FISH, vingt-deux ont permis d'obtenir des signaux d'hybridation interprétables et trois ont donné des images d'ADN apoptotique non exploitables.

3.2 Analyse des résultats après lecture des lames d'hybridation au microscope à fluorescence et confrontation aux observations morphologiques

Le nombre de pronuclei observé pour chacun des vingt-deux zygotes analysés ainsi que l'analyse cytogénétique obtenue après la procédure de FISH ont été reportés dans le **Tableau 2**.

La majorité des zygotes ont montré des compositions chromosomiques X, Y et 18 discordants avec le nombre de pronucléus observé **Figure 1**.

3.2.1 Zygotes 1 PN

Parmi les zygotes monopronucléés, seuls 43% (3/7) d'entre eux étaient réellement haploïdes (**Tableau 1**).

De plus, 28,6% (2/7) des zygotes se sont avérés être diploïdes au sein de ce groupe.

Il faut noter, qu'étonnamment, un zygote 1 PN présentait un signal d'hybridation pour le chromosome Y et aucun pour le chromosome X, cas de figure impossible et certainement en lien avec une anomalie technique (**Tableau 2)**.

3.2.2 Zygotes 3 PN

Parmi les zygotes tripronucléés, seulement 30% (3/10) des zygotes analysés étaient triploïdes comme attendu vis-à-vis du nombre de pronuclei observé (**Tableau 1)**.
Fait intéressant, 20% (2/10) d'entre eux se sont avérés être diploïdes.
La majorité des discordances chromosomiques portait sur des anomalies des gonosomes (**Tableau 2)**.
Selon les images acquises à partir des séquences TimeLapse® de l'Embryoscope™ ou lors de l'observation au microscope, un seul globule polaire était présent dans l'espace périvitellin de tous les zygotes tripronucléés sélectionnés.

3.2.3 Zygotes 2+1 PN

Les zygotes tripronucléés notés 2+1 PN, présentaient tous des aneuploïdies marquées par des formules chromosomiques aberrantes. Ces aberrations chromosomiques portaient particulièrement sur les gonosomes ici encore, avec notamment des anomalies touchant surtout le chromosome Y, à l'instar de la trisomie et de la tétrasomie Y recensée chez deux des zygotes de ce groupe (**Tableau 2)**.
Tout comme les zygotes 3PN, un seul corps polaire était également présent dans ce groupe.

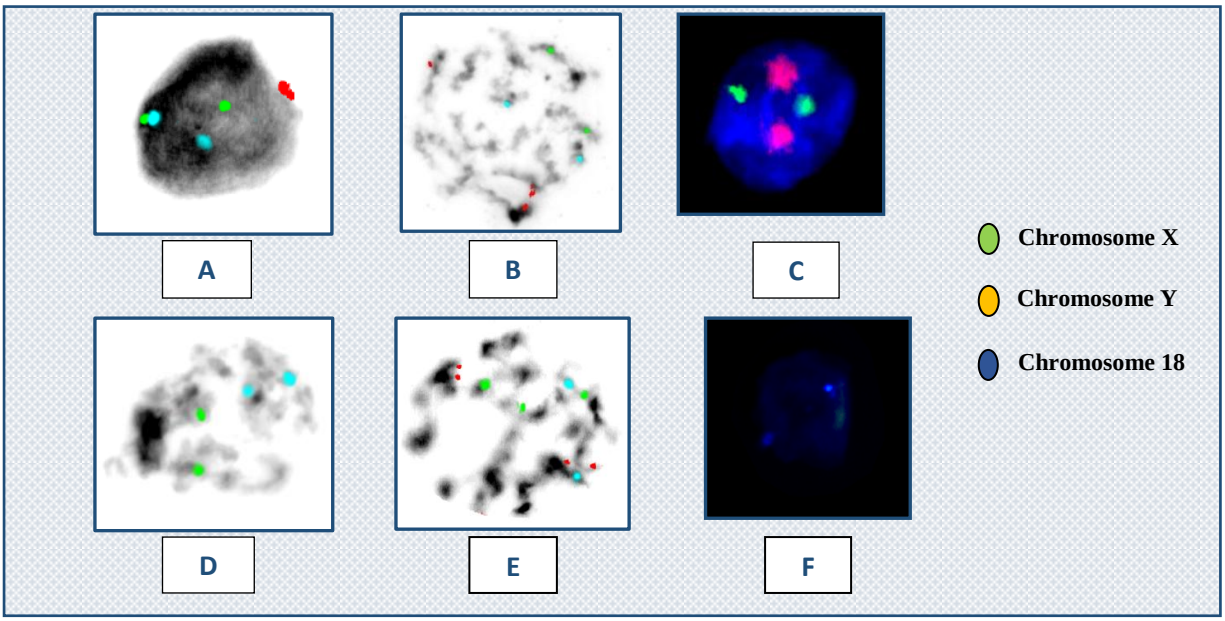
3.2.4 Zygote 2 PN bloqué à J2 après une procédure d'aide à l'activation ovocytaire

Au sein de notre cohorte, nous avons inclus des zygotes bloqués à 2PN avec deux globules polaires après deux jours de culture, qui avaient fait l'objet d'une assistance à l'activation ovocytaire après la FIV-ICSI. L'intérêt était d'évaluer l'existence potentiellement néfaste d'une aneuploïdie pouvant expliquer cette anomalie de développement. Parmi les cinq zygotes en arrêt de développement un seul a résisté au choc hypotonique.
Comme attendu, aucune anomalie de nombre de chromosomes n'a été retrouvée et le zygote s'est avéré être diploïde malgré cette absence de développement.

Tableau 1. Concordance des résultats obtenus après FISH par rapport au nombre de pronuclei observé

	1PN	3PN	2+1 PN	4PN et plus	2PN	Nombre total
Analyse cytogénétique concordante	3	3	0	1	1	8 (38%)
Analyse cytogénétique discordante	4	7	3	0	0	14 (64%)

Figure 1. Discordance entre l'analyse des zygotes par FISH et le statut pronucléaire observé



Les sondes à fluorescence vertes correspondent au signal du chromosome X. Les sondes à fluorescence orange correspondent au signal du chromosome Y. Les sondes à fluorescence bleue correspondent au signal du chromosome 18.

A : Zygotes 3PN avec une disomie X, une monosomie Y et une disomie 18
B : Zygote 2+1PN avec une disomie X, une trisomie Y et disomie 18
C : Zygote 3PN avec une disomie X, une disomie Y et une monosomie 18
D : Zygote 1PN avec une disomie X et une disomie Y
E : Zygote 2+1PN avec une trisomie X, une tétrasomie Y et disomie 18
F : Zygote 1PN avec nullosomie X, nullosomie Y et monosomie 18

Tableau 2. Analyse cytogénétique des zygotes

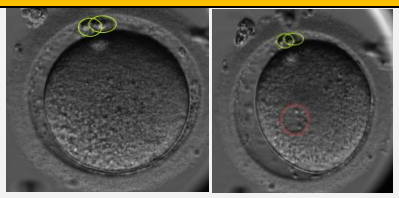
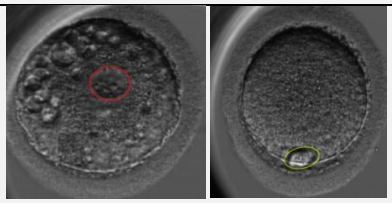
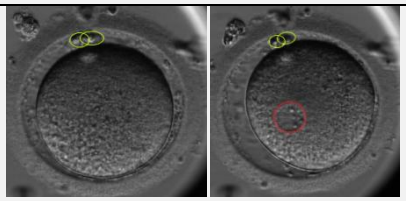
Nombre de pronuclei (PN) / Globules polaires (GP)	Résultats analyse FISH et Interprétation	Aspect morphologique lors de l'analyse microscopique (Embryoscope™ ou K System G180™)
1PN / 2GP	Y/18 18 Monosomie Y	
1PN / 1GP	X/18 Haploïdie	
1PN / 2GP	XX/18 18 Diploïdie	
1PN / 1GP	Nullosomie X/NullosomieY/ 18 DC*	
1 PN / 2GP	X Y/18 18 Diploïdie	
1 PN / 1GP	X/18 Haploïdie	
1PN / 1GP	X/18 Haploïdie	Absence de photographie
2PN (bloqué à J2) / 2GP	XX/18 18 Diploïdie	Absence de photographie
4 PN / 2GP	XXYY/18 18 18 18 Tétraploïdie	

Tableau 2. Analyse cytogénétique des zygotes (suite)

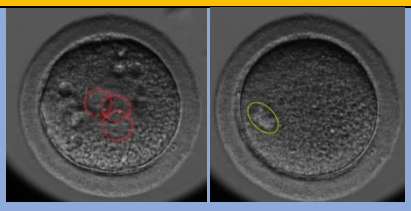
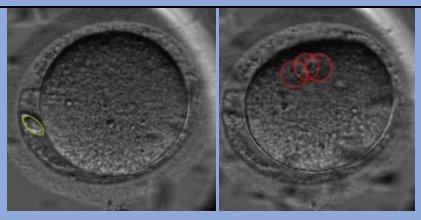
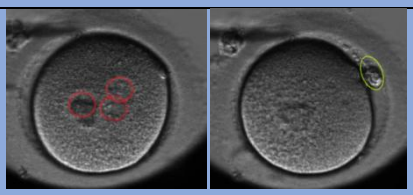
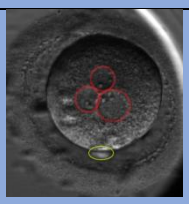
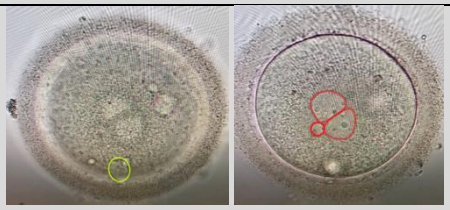
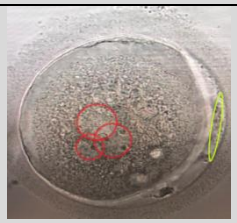
Nombre de pronuclei (PN) / Globules polaires (GP)	Résultats analyse FISH	Aspect morphologique lors de l'analyse microscopique (Embryoscope™ ou K System G180™)
3 PN	XYY/18 18 18 Triploïdie	
3PN / 1GP polyfragmenté	XY/18 18 Diploïdie	
3PN / 1GP	XY/18 18 Diploïdie	Absence de photographie
3PN / 1GP	XXYY/18 DC*	
3PN / 1GP	XXX/18 18 18 Triploïdie	Absence de photographie
3PN / 1GP	XXY/18 18 DC*	
3PN / 1GP polyfragmenté	XXY/18 18 DC*	
3PN / 1GP	XXX/18 18 18 Triploïdie	
3PN / 1GP	XXX/18 18 DC*	
3PN/ 1GP	XXYY/ Nullosomie 18 DC*	Absence de photographie

Tableau 2. Analyse cytogénétique des zygotes (suite et fin)

Nombre de pronuclei (PN) / Globules polaires (GP)	Résultats analyse FISH	Aspect morphologique lors de l'analyse microscopique (Embryoscope™ ou K System G180™)
2+1 PN / 1GP	XXXYYYY/18 18 DC*	
2+1 PN / 1GP	XXY/Nullosomie 18 DC*	
2+1 PN / 1GP polyfragmenté	XXYYY/18 18 DC*	

Les cercles rouges désignent les pronuclei. Les cercles verts désignent les corps polaires. Les images ont été obtenues soit à partir des séquences TimeLapse® lorsque les zygotes étaient incubés dans l'Embryoscope™, soit à l'aide d'un appareil photo au moment de l'observation à J1 des zygotes incubés dans le K System G180™. Lorsque les pronuclei et le corps polaire ne pouvaient être distingués dans le même plan, plusieurs clichés ont été réalisés.
Les résultats cohérents avec l'analyse morphologique sont en orange. Les résultats discordants avec l'analyse morphologique sont en rouge. Les diploïdies inattendues par rapport au profil pronucléaire sont en vert.
* DC : discordance chromosomique

4. DISCUSSION

Les aneuploïdies sont des anomalies largement présentes dans les conceptions humaines et leur détection représente un enjeu quotidien dans les laboratoires d'AMP, qui ne disposent d'aucun moyen non invasif pour évaluer la ploïdie et donc le caractère transférable ou non d'un embryon. Actuellement de nombreuses études ont retrouvés des incohérences entre le nombre de pronuclei évalué sur les critères morphologiques, et la ploïdie établie par des analyses cytogénétiques à partir d'embryons préimplantatoires issus de zygotes monopronucléés et tripronucléés.

Le statut aneuploïde des zygotes tripronucléés est sujet à controverse, car, malgré ce pronucléus surnuméraire, des rapports retrouvent des taux significatifs de diploïdie parmi des zygotes ou des embryons dérivés de zygotes tripronucléés. Ainsi, l'un des rares travaux menés sur les zygotes, retrouve 60% de triploïdie et 36% de diploïdie pour les chromosomes X, Y et 18, chez vingt-cinq zygotes tripronucléés issus d'ICSI (Grossman *et al.*, 1997). De même, en 2005, Chen *et al.*, retrouvent 25% de diploïdie et 70,83% de triploïdie en utilisant la FISH avec des sondes spécifiques des chromosomes X et Y, chez vingt-quatre zygotes tripronucléés obtenus après une ICSI. Plus récemment, Grau *et al.*, (2011) effectuent une analyse plus large portant sur les chromosomes X, Y, 18, 13 et 21 par FISH, à partir d'un nombre d'embryons en clivage issus de zygotes tripronucléés équivalent à l'étude précédente. Ils rapportent ainsi 32% de triploïdie et 52% de diploïdie chez ces embryons post-zygotiques. Cependant, l'analyse de Grau *et al.,* est fondée sur l'étude d'un seul blastomère, ce qui limite l'interprétation du reflet de la ploïdie dans l'ensemble de la cellule, puisque le risque de mosaïcisme au stade préimplantatoire est non négligeable. Ce risque est d'ailleurs rapporté à 50% dans une étude récente (Baart *et al.,* 2006) basée sur une double évaluation du contenu chromosomique d'embryon en clivage d'abord au stade J3 puis au stade J5, grâce à l'utilisation d'une dizaine de sondes chromosomiques par FISH. Ainsi, les taux retrouvés par Grau *et al.,* pourraient être faussés si l'on tient compte du mosaïcisme, ce qui expliquerait les différences entre leurs résultats et ceux des deux autres études. Par ailleurs, les résultats rapportés par Chen *et al.* sont limités par la restriction de leur analyse chromosomique, portant uniquement sur les gonosomes. En effet, la distinction entre le caractère monosomique, trisomique ou disomique par rapport à l'haploïde, la triploïdie ou diploïdie, semble difficile à établir dans ce cas, d'où l'intérêt de tester au moins une paire d'autosome supplémentaire (Munné *et al.*, 1993). Cela

conduirait à une sous-estimation des anomalies chromosomiques détectées et par conséquent une surestimation du pourcentage de zygotes 3PN diploïdes retrouvés dans leur étude.

Cependant, bien que ces études divergent dans leur méthodologie, leurs résultats démontrent qu'il existe un pourcentage de discordance entre le nombre de pronucléus préalablement déterminé et l'analyse cytogénétique qui en découle, ce qui est en accord avec nos observations. En effet, la portée de nos résultats est limitée par le faible nombre de zygotes tripronucléés que nous avons pu analyser, mais nous avons pu malgré tout mettre en évidence des désaccords entre l'aspect morphologique et la ploïdie parmi ce petit groupe de zygotes.

Concernant les zygotes monopronucléés, bien que l'activation parthénogénétique soit considérée comme la cause principale de survenue de cette anomalie numérique, le reflet du contenu chromosomique par rapport au nombre de pronucléus retrouvé dans les travaux menés dans la littérature, amènent à entrevoir d'autres mécanismes. Cependant, les avis divergent à ce propos. Ainsi, Staessen et Van Steirteghem (1997) ont analysé par FISH chaque blastomère provenant de soixante-et-un embryons au stade J3 dérivés de zygotes monopronucléés après ICSI, en testant des sondes spécifiques aux chromosomes X, Y et 18. Ils retrouvent 31.2% d'haploïdie et 27,9% de diploïdie avec une répartition équivalente de diploïdie XX et XY. Cela les a amenés à conclure qu'une fécondation normale avait eu lieu et qu'un asynchronisme d'apparition des pronuclei avec un pronucléus précoce expliquait ces observations. A l'inverse, dans une étude antérieure, Sultan *et al.,* (1995) ont fait de même à partir de vingt-et-un embryons J3 issus de zygotes à 1 PN après ICSI, et ont retrouvé 66.7% d'haploïdie contre 9,5% de diploïdie, en ne détectant qu'un seul embryon diploïde XY. Dans leur cas, l'activation parthénogénétique constituait la cause principale de formation des zygotes 1PN à l'issue des procédures. Dans notre analyse, nous avons retrouvé 43% d'haploïdie et 28,6% de diploïdie pour nos zygotes 1PN, avec une proportion égale de XX et de XY. Ceci a pu être la conséquence d'une apparition asynchrone des pronuclei comme cela a été évoqué par Staessen et Van Steirteghem précédemment. Ces résultats sont confortés par les constatations de Nagy *et al.,* (1994), qui ont observé que l'apparition d'un pronucléus ou des pronuclei pouvait se faire entre 6 et 8 heures après la micro-injection chez des ovocytes normalement fécondés. Dans notre étude, ce phénomène a pu survenir pour les zygotes cultivés dans le K-System G185^{TM}, puisque l'observation des pronuclei se faisait ponctuellement entre 18 et 20 heures après la réalisation de l'ICSI, et ne pouvait se faire en continu comme cela a été le cas des zygotes cultivés dans l'Embryoscope^{TM}. De plus, nous

avions, afin de nous assurer de l'absence de retard d'apparition d'un pronucléus supplémentaire, renouvelé les observations des zygotes 1PN à plusieurs reprises jusqu'à maximum 22 heures après la microinjection. Quel que soit l'incubateur dans lequel ils étaient cultivés, mais n'avions pas prévu d'observation précoce. Il est donc possible que nous n'ayons pu observer qu'un seul des deux pronuclei, si l'un d'eux était apparu précocement. Cela nous aurait conduit à considérer par erreur le zygote comme étant monopronucléé, entrainant ainsi une surestimation du taux de zygotes 1PN diploïde, par sélection inappropriée de zygotes en réalité bipronucléés dans notre étude. Néanmoins, la fusion précoce du matériel génétique maternel et paternel en un pronucléus unique est une autre raison évoquée par de nombreux auteurs pour expliquer la formation des zygotes monopronucléés (Mateo *et al.,* 2013, Kai *et al.,* 2015). Si cela était le cas, l'anomalie serait indétectable par l'utilisation des critères morphocinétiques standard, puisque la survenue de ce mécanisme engendrerait un zygote normal d'un point de vue chromosomique mais avec un seul pronucléus visible. Malgré tout, bien que notre effectif soit faible, nos résultats laissent à penser que la majorité des zygotes 1PN de notre étude sont issus d'une activation parthénogénétique, plutôt que d'une fusion précoce.

Tous les zygotes tripronucléés possédant une asymétrie de la taille des pronuclei, que nous avons notés 2+1PN, ont montré une composition chromosomique aberrante. Nos résultats semblent démontrer que le plus petit pronucléus n'est pas un pseudopronucléus issu de la fragmentation d’un des deux pronuclei, comme nous pouvions éventuellement le penser, et contient bien un jeu de chromosome surnuméraire. Ces zygotes ne sont rencontrés que rarement en AMP, puisqu'ils ne représentent que 0,7% des fécondations (Capalbo *et al.,* 2017). Cependant, ces résultats diffèrent de ceux de Capalbo *et al.,* (2017), qui ont analysé vingt-sept blastocytes dérivés de zygotes issus d'ICSI possédant deux pronuclei de même taille et un plus petit par biologie moléculaire, afin d'évaluer la ploïdie complète des embryons. Ils retrouvaient 14,3% de triploïdie et 85,7% de diploïdie, ce qui implique que la majorité des zygotes tripronucléés de leur cohorte étaient euploïdes. Parmi ces zygotes diploïdes, trois ont été transférés et deux ont permis d'obtenir des naissances vivantes. Les auteurs suggèrent de recourir à cette approche génétique améliorée afin d'augmenter les résultats de la FIV en réduisant les risques de fausses couches. Bien que ces constatations remettent en question les possibilités d'évolution vers un état euploïde de nos zygotes 2+1PN, il est difficile d'imaginer la mise en place de ce protocole dans les centres d'AMP. Ainsi, dans le cas où aucune vérification par des techniques de génétique moléculaire ne serait possible, il

faudrait continuer à considérer ces zygotes comme étant anormaux au même titre que les zygotes tripronucléés dans la pratique quotidienne.

Nous avons volontairement inclus des zygotes présentant un nombre normal de pronuclei, dont le développement s'était arrêté au stade zygotique malgré deux jours d'incubation dans l'Embryoscope$^{TM.}$ Ces zygotes ont fait l'objet d'une aide à l'activation ovocytaire grâce à l'utilisation d'ionophore calcique, procédure réservée particulièrement aux couples présentant des échecs répétés de fécondation (Ravel et al., 2016). Malgré cet arrêt de développement, l'unique zygote que nous avons pu analyser, ne présentait pas d'anomalie chromosomique numérique, et l'on peut imaginer qu'un résultat similaire aurait été retrouvé pour les quatre autres zygotes qui n'ont pu être analysé. De plus, la présence des deux pronuclei et d'un nombre adéquat de corps polaires, suggère que la fécondation s'est normalement produite et que ces anomalies ne seraient pas liées au protocole d'activation. Nous n'avons retrouvé aucune explication possible à cette absence de développement ou des cas similaires aux nôtres dans la littérature.

Par ailleurs, si nous nous penchons sur les anomalies constatées dans notre analyse, nous recensons un certain nombre d'anomalies affectant les gonosomes et particulièrement le chromosome Y. Or, la présence du chromosome Y est le seul élément qui puisse garantir la pénétration d'un spermatozoïde dans l'ovocyte.

Dans le cas des zygotes monopronucléés, cela nous permet d'éliminer la parthénogénèse comme cause de formation du pronucléus unique chez deux de nos sept zygotes monopronucléés analysés. L'une des particularités que nous avons pu constater est la présence d'une mosomie Y associée à une disomie 18 dans l'un des zygotes 1PN. Au vue de l'absence surprenante de chromosome X, cette anomalie ne peut être expliquée que par un défaut d'hybridation de la sonde spécifique du chromosome X, dans un zygote qui aurait probablement dû être diploïde.

Etonnamment, nous avons retrouvé une disomie Y chez un zygote 3PN analysé comme étant triploïde. Or, dans le cadre de l'ICSI contrairement à la FIV conventionnelle, seules deux formules pour les chromosomes sexuels sont possibles, puisque logiquement un seul spermatozoïde est injecté : XXX ou XXY (Rosenbusch 2008). Dans la mesure où l'injection de deux spermatozoïdes est très peu probable compte tenu de l'expérience technique de l'opérateur, la fécondation par un spermatozoïde diploïde semble être la raison la plus adaptée (Rosenbusch, 2008). Cependant, la présence d'un seul corps polaire contredit cette analyse et

nous pousse à envisager qu'une observation erronée du nombre de globule polaire serait l'explication la plus plausible.
Par ailleurs, bon nombre de nos zygotes tripronucléés porteurs d'une discordance chromosomique, ont émis un nombre inadéquat de signaux d'hybridation pour le chromosome Y. Ces résultats semblent en faveur d'une anomalie survenue durant la ségrégation des chromosomes au moment de la méiose dans le gamète mâle.

En ce qui concerne les limites de notre étude, la plus grande limite réside dans l'effectif limité dont nous avons disposé et qui ne nous a pas permis de réellement confronter nos résultats aux données publiées. L'une des raisons est que notre étude a été menée sur une courte période, ce qui ne nous a pas permis de récupérer un plus grand nombre de zygotes anormaux et a donc participé à notre faible effectif de départ. La faiblesse de notre effectif a été renforcée par les pertes inévitables survenues lors de la réalisation du protocole, ce qui aurait pu être amortie si nous disposions d'un échantillon initial plus grand. Ainsi, l'étude n'a pas permis d'obtenir une puissance suffisante pour la réalisation d'une analyse statistique et l'ensemble des résultats a donc été interprété de façon descriptive.
Par ailleurs, pour des raisons budgétaires évidentes, nos analyses ont été effectuées en utilisant trois sondes d'hybridation spécifiques. Si nous avions pu disposer d'un plus grand nombre de sondes, cela nous aurait permis d'avoir une précision plus importante dans notre interprétation et de révéler certainement plus d'anomalies chromosomiques, y compris chez des zygotes que nous avons jugés diploïdes.

5. CONCLUSION

Nos résultats montrent qu'il existe une grande discordance entre l'évaluation de la ploïdie basée sur les paramètres morphologiques et la réelle composition chromosomique des zygotes en cas d'anomalies de la ploïdie. Ainsi, la grande majorité de nos zygotes n'avaient pas un statut chromosomique reflétant le nombre de pronuclei observés et finalement peu de zygotes monopronucléés et tripronucléés se sont révélés être haploïdes et triploïdes. Cependant les anomalies chromosomiques au stade préimplantatoire peuvent se corriger au cours du développement et il semble difficile d'affirmer de façon définitive l'euploïdie ou l'aneuploïdie à un stade aussi précoce.

Néanmoins, ce qui ressort de ce travail est que les critères morphologiques utilisés au quotidien lors de la sélection des embryons à transférer ne sont pas d'une fiabilité absolue pour déterminer le contenu chromosomique à partir des anomalies numériques des pronuclei et cela peut conduire à l'élimination d'embryons viables.

Cependant, bien que le taux de discordance dans notre travail soit élevé et que la constitution chromosomique retrouvée ne reflète pas le nombre de pronuclei en majorité, l'aneuploïdie est largement présente chez les zygotes analysés. Cela conforte donc malgré tout le choix de ne pas utiliser ces embryons issus de zygotes jugés anormaux dans la pratique clinique, puisque nous sommes à l'heure actuelle incapable de prédire de manière non invasive la composition chromosomique exacte d'un embryon. Par ailleurs, les zygotes arborant deux pronucléi de taille similaire et un pronucléus plus petit sont bien aneuploïdes et doivent continuer à être exclus de la sélection des embryons à transférer ou à vitrifier.

Enfin, une étude complémentaire sur une période plus grande permettant d'obtenir un échantillon de zygotes anormaux plus important serait nécessaire pour approfondir nos résultats et permettre une analyse plus précise.

Bibliographie

Alper MM, Fauser BC. Ovarian stimulation protocols for IVF: is more better than less? *Reproductive BioMedicine Online* 2017;**34**:345–353.

Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, Egozcue J, Veiga A. Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertility and Sterility* 1999;**72**:696–701.

Baart EB, Martini E, Berg I van den, Macklon NS, Galjaard R-JH, Fauser BCJM, Van Opstal D. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006;**21**:223–233.

Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, Van Opstal D, Beckers NGM, Verhoeff A, Macklon NS, Fauser BCJM. Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Human Reproduction* 2007;**22**:980–988.

Balakier H, Bouman D, Sojecki A, Librach C, Squire JA. Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. *Hum Reprod* 2002;**17**:2394–2401.

Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. Detection of DNA fragmentation and meiotic segregation in human with isolated teratozoospermia. *J Assist Reprod Genet*. 2011;**28**:41-48

Burrello N, Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Torrisi C, Barone N, Pafumi C, D'Agata R, Vicari E. Chromosome analysis of epididymal and testicular spermatozoa in patients with azoospermia. *Eur J Hum Genet* 2002;**10**:362–366.

Calogero A, Burrello N, De Palma A, Barone N, D'Agata R, Vicari E. Sperm aneuploidy in infertile men. *Reproductive BioMedicine Online* 2003;**6**:310–317.

Calogero AE, De Palma A, Graziose C, Barone N, Romeo R, Rappazo G, D'Agata R. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum Reprod* 2001;**16**:1172–1179.

Capalbo A, Treff N, Cimadomo D, Tao X, Ferrero S, Vaiarelli A, Colamaria S, Maggiulli R, Orlando G, Scarica C, *et al.* Abnormally fertilized oocytes can result in healthy live births: improved genetic technologies for preimplantation genetic testing can be used to rescue viable embryos in in vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility* 2017;**108**:1007-1015.e3.

Chen Z, Yan J, Feng HL. Aneuploid analysis of tripronuclear zygotes derived from in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in humans. *Fertil Steril* 2005;**83**:1845–1848.

Cheng J-M, Liu Y-X. Age-Related Loss of Cohesion: Causes and Effects. *Int J Mol Sci* 2017;**18**:1578

Chiang T, Duncan FE, Schindler K, Schultz RM, Lampson MA. Evidence that weakened centromere cohesion is a leading cause of age-related aneuploidy in oocytes. *Curr Biol* 2010;**20**:1522–1528.

Cimadomo D, Fabozzi G, Vaiarelli A, Ubaldi N, Ubaldi FM, Rienzi L. Impact of Maternal Age on Oocyte and Embryo Competence. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;**9**: 327

Clift D, Schuh M. Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;**14**:549–562.

Colaco S, Sakkas D. Paternal factors contributing to embryo quality. *J Assist Reprod Genet* 2018;**35**:1953–1968.

Egozcue S, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Egozcue J. Increased Incidence of Meiotic Anomalies in Oligoasthenozoospermic Males Preselected for Intracytoplasmic Sperm Injection. *J Assist Reprod Genet* 2000;**17**:307–309.

Eichenlaub-Ritter U. Oocyte ageing and its cellular basis. *Int J Dev Biol* 2013;**56**:841–852.

Feng H, Hershlag A. Fertilization abnormalities following human in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Microsc Res Tech* 2003;**61**:358–361.

Garcia Ferreyra J, Villegas L, Romero R, Zavala P, Hilario R, Casafranca G, Dueñas-Chacon J. Sperm DNA Fragmentation is Significantly Increased in Those Men with Morphologically Abnormal Spermatozoa. *JFIV Reprod Med Genet* 2014;**02**:3

Garcia Ferreyra, Romero R, Hilario R, Dueñas-Chacon J. High Levels of DNA Fragmentation Observed in an Infertile Population Attending a Fertility Center are Related to Advanced Paternal Age. *ResearchGate* [Internet] 2012; Available from: https://www.researchgate.net/publication/262601398_High_Levels_of_DNA_Fragmentation_Observed_in_an_Infertile_Population_Attending_a_Fertility_Center_are_Related_to_Advanced_Paternal_Age.

García-Ferreyra J, Luna D, Villegas L, Romero R, Zavala P, Hilario R, Dueñas-Chacón J. High Aneuploidy Rates Observed in Embryos Derived from Donated Oocytes are Related to Male Aging and High Percentages of Sperm DNA Fragmentation. *Clin Med Insights Reprod Health* 2015;**9**:21–27.

Gat I, Tang K, Quach K, Kuznyetsov V, Antes R, Filice M, Zohni K, Librach C. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with blastocyst aneuploidy or morphological grading. *PLoS One* [Internet] 2017;**12**:e0179002

Goud P, Goud A, Van Oostveldt P, Van der Elst J, Dhont M. Fertilization abnormalities and pronucleus size asynchrony after intracytoplasmic sperm injection are related to oocyte postmaturity. *Fertility and Sterility* 1999;**72**:245–252.

Grau N, Escrich L, Martín J, Rubio C, Pellicer A, Escribá M-J. Self-correction in tripronucleated human embryos. *Fertil Steril* 2011;**96**:951–956.

Grossmann M, Calafell JM, Brandy N, Vanrell JA, Rubio C, Pellicer A, Egozcue J, Vidal F, Santaló J. Origin of tripronucleate zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;**12**:2762–2765.

Haaf T, Hahn A, Lambrecht A, Grossmann B, Schwaab E, Khanaga O, Hahn T, Tresch A, Schorsch M. A high oocyte yield for intracytoplasmic sperm injection treatment is associated with an increased chromosome error rate. *Fertility and Sterility* 2009;**91**:733–738.

Herbert M, Kalleas D, Cooney D, Lamb M, Lister L. Meiosis and maternal aging: insights from aneuploid oocytes and trisomy births. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;**7**:a017970.

Holubcová Z, Kyjovská D, Martonová M, Páralová D, Klenková T, Otevřel P, Štěpánová R, Kloudová S, Hampl A. Egg maturity assessment prior to ICSI prevents premature fertilization of late-maturing oocytes. *J Assist Reprod Genet* 2019;**36**:445–452.

Isiklar A, Mercan R, Balaban B, Alatas C, Aksoy S, Urman B. Impact of oocyte pre-incubation time on fertilization, embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Reproductive BioMedicine Online* 2004;**8**:682–686.

Jacobs M, Stolwijk AM, Wetzels AM. The effect of insemination/injection time on the results of IVF and ICSI. *Hum Reprod*. 2001;**16**:1708**-** 1713.

Jessberger R. Age-related aneuploidy through cohesion exhaustion. *EMBO Rep* 2012;**13**:539–546.

Kaarouch I, Bouamoud N, Louanjli N, Madkour A, Copin H, Benkhalifa M, Sefrioui O. Impact of sperm genome decay on Day-3 embryo chromosomal abnormalities from advanced-maternal-age patients. *Molecular Reproduction and Development* 2015;**82**:809–819.

Kai Y, Iwata K, Iba Y, Mio Y. Diagnosis of abnormal human fertilization status based on pronuclear origin and/or centrosome number. *J Assist Reprod Genet* 2015;**32**:1589–1595.

Kalmbach KH, Antunes DMF, Dracxler RC, Knier TW, Seth-Smith ML, Wang F, Liu L, Keefe DL. Telomeres and human reproduction. *Fertil Steril* 2013;**99**:23–29

Keefe DL. Telomeres and meiosis in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 2007;**64**:115–116.

Levron J, Munné S, Willadsen S, Rosenwaks Z, Cohen J. Male and female genomes associated in a single pronucleus in human zygotes. *Biol Reprod* 1995;**52**:653–657.

Macas E, Imthurn B, Rosselli M, Keller PJ. The chromosomal complements of multipronuclear human zygotes resulting from intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;**11**:2496–2501.

Magli M, Gianaroli L, Ferraretti A, Gordts S, Fredericks V, Crippa A. Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos. *Reproductive BioMedicine Online* 2009;**18**:536–542.

Malter HE, Cohen J. Embryonic development after microsurgical repair of polyspermic human zygotes. *Fertility and Sterility* 1989a;**52**:373–380.

Mateo S, Parriego M, Boada M, Vidal F, Coroleu B, Veiga A. In vitro development and chromosome constitution of embryos derived from monopronucleated zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2013;**99**:897-902.e1.

Mazzilli R, Cimadomo D, Vaiarelli A, Capalbo A, Dovere L, Alviggi E, Dusi L, Foresta C, Lombardo F, Lenzi A, *et al.* Effect of the male factor on the clinical outcome of intracytoplasmic sperm injection combined with preimplantation aneuploidy testing: observational longitudinal cohort study of 1,219 consecutive cycles. *Fertility and Sterility* 2017;**108**:961-972.e3.

Munné S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* 1998;**4**:842–855.

Munné S, Tang YX, Grifo J, Cohen J. Origin of single pronucleated human zygotes. *J Assist Reprod Genet* 1993;**10**:276–279.

Nagy ZP, Dozortsev D, Diamond M, Rienzi L, Ubaldi F, Abdelmassih R, Greco E. Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. *Fertility and Sterility* 2003;**80**:67–74.

Nagy ZP, Liu J, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994;**9**:1743–1748.

Papale L, Fiorentino A, Montag M, Tomasi G. The zygote. *Human Reproduction* 2012;**27**:i22–i49.

Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human Reproduction* 1997;**12**:532–541.

Perreault SD, Wolff RA, Zirkin BR. The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Developmental Biology* 1984;**101**:160–167.

Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K. Un Ménage à Quatre: The Molecular Biology of Chromosome Segregation in Meiosis. *Cell* 2003;**112**:423–440.

Pfeffer J, Pang M-G, Hoegerman SF, Osgood CJ, Stacey MW, Mayer J, Oehninger S, Kearns WG. Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 1999;**72**:472–478.

Pieters MH, Dumoulin JC, Ignoul-Vanvuchelen RC, Bras M, Evers JL, Geraedts JP. Triploidy after in vitro fertilization: cytogenetic analysis of human zygotes and embryos. *J Assist Reprod Genet* 1992;**9**:68–76.

Ravel C, Kazdar N, Drapier H, Duros S, Viard P. Aide à l'activation ovocytaire - Un nouvel atout dans le traitement des infertilités masculines sévères [Assisted oocyte activation: a new tool for severe male factor infertility treatment]. *Med Sci* (Paris). 2016;**32**:198**-** 203.

Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Hodges CA, Hunt PA, Liebe B, Scherthan H, Jessberger R. Cohesin SMC1β is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol* 2004a;**6**:555–562.

Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Hodges CA, Hunt PA, Liebe B, Scherthan H, Jessberger R. Cohesin SMC1β is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nature Cell Biology* 2004b;**6**:555–562.

Revenkova E, Herrmann K, Adelfalk C, Jessberger R. Cohesin expression restricted to the pre-dictyate stages of oocyte development provides full fertility and prevents aneuploidy. *Curr Biol* 2010;**20**:1529–1533.

Rodrigo L, Peinado V, Mateu E, Remohí J, Pellicer A, Simón C, Gil-Salom M, Rubio C. Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos. *Fertility and Sterility* 2010;**94**:1380–1386.

Rogers NT, Hobson E, Pickering S, Lai FA, Braude P, Swann K. Phospholipase Czeta causes Ca2+ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction* 2004;**128**:697–702.

Rosenbusch B, Schneider M, Gläser B, Brucker C. Cytogenetic analysis of giant oocytes and zygotes to assess their relevance for the development of digynic triploidy. *Hum Reprod* 2002;**17**:2388–2393.

Rosenbusch B, Schneider M, Sterzik K. The chromosomal constitution of multipronuclear zygotes resulting from in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997;**12**:2257–2262.

Rosenbusch BE. Mechanisms giving rise to triploid zygotes during assisted reproduction. *Fertil Steril* 2008;**90**:49–55.

Sadowy S, Tomkin G, Munné S, Ferrara-Congedo T, Cohen J. Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote* 1998;**6**:137–141.

Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA Damage in Ejaculated Human Spermatozoa and the Possible Involvement of Apoptosis1. *Biology of Reproduction* 2002;**66**:1061–1067.

Schmidt L, Sobotka T, Bentzen JG, Nyboe Andersen A, on behalf of the ESHRE Reproduction and Society Task Force. Demographic and medical consequences of the postponement of parenthood. *Human Reproduction Update* 2012;**18**:29–43.

Sekhon L, Shaia K, Santistevan A, Cohn KH, Lee JA, Beim PY, Copperman AB. The cumulative dose of gonadotropins used for controlled ovarian stimulation does not influence the odds of embryonic aneuploidy in patients with normal ovarian response. *J Assist Reprod Genet* 2017;**34**:749–758.

Silber S, Escudero T, Lenahan K, Abdelhadi I, Kilani Z, Munné S. Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction. *Fertility and Sterility* 2003;**79**:30–38.

Staessen C, Van Steirteghem AC. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997;**12**:321–327.

Stein D, Ukogu C, Ganza A, Gounko D, Lee J, Bar-Chama N, Copperman AB. Paternal contribution to embryonic competence. *Cent European J Urol* 2019;**72**:296–301.

Sultan KM, Munné S, Palermo GD, Alikani M, Cohen J. Chromosomal status of uni-pronuclear human zygotes following in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995;**10**:132–136.

Sun Q-Y. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microsc Res Tech* 2003;**61**:342–348.

Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 1999;**402**:371–372.

Sutovsky P, Schatten G. Depletion of Glutathione during Bovine Oocyte Maturation Reversibly Blocks the Decondensation of the Male Pronucleus and Pronuclear Apposition during Fertilization1. *Biology of Reproduction* 1997;**56**:1503–1512.

Tang SS, Gao H, Zhao Y, Ma S. Aneuploidy and DNA fragmentation in morphologically abnormal sperm. *International Journal of Andrology* 2010;**33**:e163–e179.

Tarin JJ. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Mol Hum Reprod* 1996;**2**:717–724.

Treff NR, Su J, Taylor D, Scott RT. Telomere DNA Deficiency Is Associated with Development of Human Embryonic Aneuploidy. *PLoS Genet* [Internet] 2011;**7**: e1002161

Vagnini L, Baruffi R, Mauri A, Petersen C, Massaro F, Pontes A, Oliveira J, Franco J. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reproductive BioMedicine Online* 2007;**15**:514–519.

Van Blerkom J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion* 2011;**11**:797–813.

Van Dyk Q, Lanzendorf S, Kolm P, Hodgen GD, Mahony MC. Incidence of aneuploid spermatozoa from subfertile men: selected with motility versus hemizona-bound5. *Human Reproduction* 2000;**15**:1529–1536.

Watanabe Y, Nurse P. Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* 1999;**400**:461–464.

Wiker S, Malter H, Wright G, Cohen J. Recognition of paternal pronuclei in human zygotes. *J Assist Reprod Genet* 1990;**7**:33–37.

Zhang X, Wu XQ, Lu S, Guo YL, Ma X. Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. *Cell Res* 2006;**16**:841–850.

Zollner U, Zollner K-P, Hartl G, Dietl J, Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Human Reproduction* 2002;**17**:1327–1333.

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis 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.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu 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 déshonoré et méprisé si j'y manque.

Titre : Analyse de la constitution chromosomique des zygotes mono- et poly- pronucléés par Hybridation In Situ par Fluorescence et confrontation au nombre de pronuclei observés

Résumé :

Objectif: Comparer le statut pronucléaire de zygotes issus d'ICSI présentant une anomalie du nombre de pronucléus à leur composition chromosomique établit par hybridation in situ par fluorescence (FISH), en utilisant des sondes spécifiques des chromosomes X, Y et 18.

Matériels: Analyse cytologique à l'aide de sondes fluorescentes pour les chromosomes X, Y et 18, de trente-neuf zygotes de FIV-ICSI provenant de 23 couples et présentant une anomalie numérique des pronuclei lors de l'analyse microscopique préalable.

Résultats: 43% (3/7) des zygotes monopronucléés étaient haploïdes et 23% (3/13) des zygotes tripronucléés étaient triploïdes.

28,6% des zygotes monopronucléés (2/7) et 15,4% (2/13) des zygotes tripronucléés étaient diploïdes.

Conclusion: Il existe une grande discordance entre l'évaluation de la ploïdie basée sur les paramètres morphologiques et la réelle composition chromosomique des zygotes.

Mots clés : Zygotes, FIV-ICSI, Triplonucléés, Monopronucléés, FISH, Ploïdie

---

Title : Chromosomal constitution analysis of mono- and poly- pronucleated zygotes by Fluorescence In Situ Hybridization and comparison with pronuclei number observed

Abstract :

Objective: Compare the pronuclear status of zygotes from ICSI with an abnormality of the pronucleus number to their chromosomal composition applied by fluorescence in situ hybridization (FISH), using probes specific for chromosomes X, Y and 18.

Materials: Cytological analysis using fluorescent probes for chromosomes X, Y and 18, of thirty-nine IVF-ICSI zygotes from 23 couples and with pronuclear numericals anomalies detected during the prior microscopic analysis.

Results: 43% (3/7) of the monopronucleated zygotes were haploids and 23% (3/13) of the tripronucleated zygotes were triploids.28.6% of the monopronucleated zygotes (2/7) and 15.4% (2/13) of the tripronucleated zygotes were diploid.

Conclusion: There is a great difference between the evaluation of ploidy based on morphological parameters and the actual chromosomal composition of zygotes.

Keywords : Zygote, IVF-ICSI, Tripronucleated, Monopronucleated, FISH, Ploidy