



# Le diagnostic pré-implantatoire: comparaison de deux stratégies de biopsies embryonnaire, au stade clivé et au stade blastocyste

Julie Bacus

► **To cite this version:**

Julie Bacus. Le diagnostic pré-implantatoire: comparaison de deux stratégies de biopsies embryonnaire, au stade clivé et au stade blastocyste. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-03019857

**HAL Id: dumas-03019857**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03019857>**

Submitted on 23 Nov 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.

**U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES**

Année 2020

Thèse n°3066

THESE POUR L'OBTENTION DU  
**DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE**

**DIPLOME D'ÉTUDES SPECIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE**

Présentée et soutenue publiquement

Par BACUS, Julie, Anne, Michèle,

Née le 16/12/1991 à Essey-lès-Nancy

Le 18 Septembre 2020, à Bordeaux

**LE DIAGNOSTIC PRÉ-IMPLANTATOIRE : COMPARAISON  
DES STRATÉGIES DE BIOPSIES EMBRYONNAIRES AU  
STADE CLIVÉ ET AU STADE BLASTOCYSTE.**

Sous la direction du Dr Arnaud REIGNIER

Membres du jury :

M. FRÉOUR Thomas

M. REIGNIER Arnaud

M. JIMENEZ Clément

Mme PAPAXANTHOS Aline

Mme CHANSEL-DEBORDEAUX Lucie

Mme ROORYCK THAMBO Caroline

Président

Directeur de thèse

Rapporteur

Juge

Juge

Juge

## REMERCIEMENTS

À mon président du jury, Monsieur le Professeur Thomas Fréour,  
Merci de me faire l'honneur de t'être déplacé pour présider ce jury de thèse.  
Ta grande accessibilité et facilité à mettre à l'aise, et ce dès nos premières prises de contact par mail, m'ont beaucoup impressionnée. Un chef définitivement hors du commun.  
Après sept mois passés dans ton service, je ressors grandie.

À mon directeur de thèse, Monsieur le Docteur Arnaud Reignier,  
Et dire qu'au début je n'arrivais pas à te comprendre lorsque tu parlais à 300 à l'heure !  
Ta personnalité atypique marque immédiatement et définitivement tous les esprits.  
Un jeune chef en or dont je compte bien m'inspirer.  
Encore mille mercis pour m'avoir encadrée et désacralisé l'événement vis-à-vis du stress !

À Madame le Docteur Aline Papaxanthos,  
Je vous remercie de me faire l'honneur d'être membre de ce jury de thèse aujourd'hui et de juger mon travail.  
Je vous suis très reconnaissante pour toute la confiance que vous m'accordez et qui me permet d'inscrire la suite de mon avenir professionnel au sein de votre service.  
Soyez assurée de mon plus profond respect.

À Madame le Docteur Lucie Chancel-Debordeaux,  
Ton caractère dynamique, pédagogique et proactif dans la recherche nous pousse à nous dépasser dans notre apprentissage scientifique au quotidien.  
Après mon mémoire de master 2, j'espère entreprendre d'autres travaux futurs avec toi et je suis impatiente de poursuivre mon parcours professionnel à tes côtés.

À Madame le Professeur Caroline Rooryck Thambo,  
Pour avoir immédiatement accepté de participer à ce jury de thèse, veuillez trouver ici le témoignage de toute ma reconnaissance.

À Monsieur le Professeur Clément Jimenez,

Merci d'avoir accepté d'apporter un jugement extérieur sur mon travail.

Merci pour le partage de vos connaissances approfondies et vos riches expériences dans notre domaine qu'est la biologie de la reproduction, sans oublier vos blagues et points de culture générale lors de nos déjeuners à l'internat !

A l'ensemble du service de biologie de la reproduction de Bordeaux,

J'ai commencé mon parcours avec vous et je le poursuivrai autant de temps qu'il m'en sera donné l'opportunité, je l'espère donc pour longtemps !

À Carole, qui m'a connu dès mon premier semestre dans la spécialité, merci pour ces mois de formation en spermiologie, toujours dans la plus grande bonne humeur !

En tant qu'experts de la discipline, Sylvie, Maïté, Marie-Caroline, Hervé et Jean-François, je suis ravie de poursuivre ma formation et mon parcours auprès de vous.

Aux techniciennes du CECOS, Cathy, Pascale et Véronique, toujours disponibles entre deux congélations.

Aux filles du secrétariat, Patricia, Corinne et Marie-Caroline, d'une aide précieuse lorsqu'est venu le moment de rechercher les grandes feuilles oranges et petites fiches blanches !

Aux filles qui facilitent notre travail et effacent nos traces au quotidien, Audrey, Vanessa et Emma.

À Claire, aux passées et futures consultations intéressantes faites avec toi.

À Monique, qui aura bien mérité son départ à la retraite, après toutes ces années à faire tourner le service avec son énergie débordante. À Jean-Christophe, sa relève.

À Édouard, qui m'aura transmis le flambeau avec ses conseils avisés.

À Juliette, fraîche et pimpante, qui arrive même à rendre la qualité intéressante !

À Volcy, toujours un mot pour les internes et accessible pour la moindre de nos questions, merci pour ta gentillesse et ton soutien au quotidien.

À tous les techniciens de Jean-Villar, Stéphane, Virginie, Martha, Nadine, Mireille, Patrick ;

Aux secrétaires, Stéphanie, Maud ; Et aux biologistes, Alexandre et Pauline.

Merci d'avoir pris sur votre précieux temps pour me former lors de mes débuts dans cette belle spécialité. J'espère vraiment pouvoir travailler de nouveau en collaboration avec vous dans l'avenir.

A toute l'équipe du laboratoire de Nantes, un semestre en inter-chu intense, où j'ai beaucoup appris tant professionnellement qu'humainement.

À tous les biologistes, Sophie X2, Carole, Arnaud, Thomas, un grand merci pour toutes les robustes connaissances que vous m'avez apporté pendant ce semestre rallongé.

Merci à tous les techniciens, du haut comme du bas : Pierre « vitrificator », Fabienne, Florence, Delphine X2, Audrey, Clélia, Marie-Luce et une pensée particulière pour Sandrine, une deuxième maman pendant le confinement.

À Jenna, pour ton aide précieuse dans le domptage de Medifirst et mes recueils de données interminables ahah

À Elisabeth, pour ton efficacité et rapidité d'action dans le service.

À Blandine, Bernadette, Sonia, Aurélie, Véronique, Adeline, Marie...

À Sophie, Gaëlle, Amélie et Anne-Laure du laboratoire de génétique, qui m'ont permis de découvrir l'autre facette du DPI l'espace de quelques jours.

À notre binôme de folie formé avec Chloé, tout aussi douée en BDR qu'en pâtisserie, un semestre bien riche et une super rencontre !

À nos co-internes de gynéco, Clémence, Aude, Emma et Gauthier, je repars pleins de souvenirs en tête en attendant nos futures soirées, à quand notre prochain sondage ? ^^

Merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer dans les différents services de biologie médicale au cours de mon internat, toute votre expertise m'a permis d'acquérir des connaissances polyvalentes solides qui me seront toujours utiles dans l'exercice de ma profession future.

À tous mes biologistes bordelais préférés,

Sacré semestre d'hémato, une team de choc et Laurent, un chef au top !

Merci aux vieux singes : Papa Castor, un puit de science qui m'impressionnera toujours,

Jacques, ce beau gosse qu'on ne décrit plus,

Et Thib qui ne loupe pas une occasion pour oublier le S, et encore j'en passe...

Aux bébés de l'époque tout comme moi : ma Ju, copine de l'Est avec ses « forts » rajoutés dans chacune de ses phrases, tu vas me manquer une fois retournée dans tes îles....

Bobby et ta béquille que je ne porterai définitivement jamais, mais ça tu le sais déjà, désolé !

À ma Momo évidemment, si unique de par ta personnalité et pour notre amitié sincère, honnête, inébranlable. Malgré la distance physique qui nous sépare désormais, rien ne pourra jamais nous séparer. Nos soirées hebdomadaires me manquent mais sont heureusement remplacées par de beaux WE et, ce n'est que partie remise, bientôt des vacances ! ;)

Sans oublier toutes celles et ceux que j'ai eu la chance de connaître au cours de mes différents stages : Maxime, toujours là pour noter assidûment toutes les Bacus, me poussant à déposer brevet (je vais le faire promis, faut qu'on négocie par contre) ; Marine, mon chaton préféré (avec Thib bien sûr) ; Guillaume dixit Guigui, Cécile, Sarrah, Micka...

Aux FIVistes bordelais, Constance, Chloé, Nathalie, notre Elvivi un sacré phénomène et Emmanuelle avec qui j'ai trop hâte d'être future co-chef ☺

À tous mes amis rencontrés à l'internat,  
Jordane, l'athlète et proprio d'une belle part de camembert ahah  
Isaline et notre super voyage au Japon « hyper organisé » bien sûr ... ^^  
Mathilde, bouffée par ta trop grande gentillesse, tu es une future neurochirurgienne brillante, crois en toi !

À la vilaine coloni,  
Un semestre en inter-chu complètement fou ! Dire que j'ai failli ne pas vous connaître avant ce confinement... Il n'aura pas eu que du négatif finalement ce Covideyyyy (non mais T'ES MALADE ?! Faut pas dire ça !).  
Petite attention particulière à Alex, qui saura quoi en penser et rêvera probablement de tableaux Excel® lors de cette lecture...

À mes amis pour la vie de Nancy city,  
Valou et son emploi du temps de ministre mais malgré tout, toujours là si besoin,  
Panier et notre bébé licorne à jamais dans nos cœurs,  
Ma Belle Gosse d'amouuuur à moi ou notre Ref internationale au choix !  
Jojo et son déhanché unique sur Aya Nakamura,  
Titi, mon nouveau voisin sudiste possédant un petit coin de paradis bayonnais,  
Ma Charlotte, une oreille toujours attentive qui fait du bien,  
Djeffrey, Mama, Cycy, Franco, PA.....  
Bravet et nos souvenirs inoubliables avec le Dodo,  
Rom qui m'a toujours fait décomplexer sur mon petit bonnet B :P  
À ma Vava, nos parcours si différents ne nous ont pas pour autant séparées.  
À Loulou, de la part de Chouchou, un si beau couple qui dure malgré la distance !

À Aline, si heureuse que nos chemins se soient rejoints après nos retrouvailles improbables au Leclerc® !

À ma Clo, une amitié de si longue date qu'on ne compte plus les années, j'ai souvent en tête l'anecdote du dentifrice au ski et ta maman outrée face à mon inaptitude à faire une rosace LOL

À Claude et Claude, Sylvie et Thomas, grands-parents et famille d'adoption, à tous nos magnifiques séjours passés à Belle-Ile-en-Mer.

À Éliane et Alain, qui se sont si bien occupés de nous étant petites, toujours les premiers à penser à nos anniversaires respectifs, accompagnés d'une photo inédite !

À Jean et Dany, pour leurs petits mots toujours attentionnés depuis l'autre côté du jardin.

À Véga.

A mes très chers grands-parents, partis bien trop tôt.

Vous me manquez terriblement. J'espère que vous êtes fiers de moi depuis là-haut, autant que je le suis d'être votre petite fille à jamais.

À Michel, une carrière exemplaire à la Cristallerie de Baccarat entre autres. Un grand homme en plus d'avoir été un grand-père exceptionnel.

À Jacqueline et ses inimitables coquillettes jambon-beurre du dimanche soir, à ses vives embrassades et pincements de joues, qui nous disait toujours « manges ma petite, tu ne sais pas qui est-ce qui te mangera » !

À Marcelle, à nos trop rares moments partagés ensemble, la maladie t'ayant emportée bien trop vite... Encore aujourd'hui on peut distinguer tes traits fins sur mon visage. Tes poupées, coussins et autres objets confectionnés par tes soins sont toujours auprès de moi.

À tous les membres de ma famille, chacun jouant un rôle primordial dans ma vie.

À mes cousins-cousines, Nicolas, Guillaume, Charles, Marion, Sophie.

À ma marraine Anne et Jean-François, à ma tantine Catchoune.

Et à toute la descendance qui se poursuit ...

Quelle belle famille nous sommes !!!

A mes très chers parents, sans qui ce si long parcours n'aurait pas été possible. Un énorme merci pour votre soutien immuable, vous pouvez être fiers de ma réussite qui est surtout la vôtre. Je vous aime.

A mon papa, aussi appelé « Man » par ses filles chéries, à son plus grand désarroi !

Nous avons traversé tant de choses ensemble que nous avançons encore, pas à pas, tournés vers l'avenir qui sera beau.

Je revois encore tes discrètes larmes quand je t'ai annoncé ma réussite au concours de médecine et je ne cesse depuis de ressentir toute ta grande fierté à travers tes yeux.

Je suis ravie que tu m'aies fait partager ta passion pour le tennis depuis que je suis toute petite, une vraie passion familiale ! Et ne t'inquiète pas, je galère encore à gagner une partie entière contre toi ;) )

A ma maman chérie, parce qu'aucun mot ne peut traduire notre relation mère-fille si particulière et intense. Tu es mon exemple, mon modèle.

Ta grande force morale de combattante m'impressionnera toujours face aux difficiles épreuves de la vie, qui hélas ne t'épargne pas... Tu as toujours su te relever et nous prouver que rien n'est impossible. Tu donnes déraisonnablement sans rien attendre en retour.

Tout l'amour inconditionnel que tu me portes me fait aller de l'avant chaque jour.

Merci d'être toujours là quand je vais bien, mais aussi moins bien, et quand j'ai besoin de dire des « bêtises » comme tu me dis souvent. Même caractère hein, les souris ne font pas des chats !

A ma poulette d'amour,

Tellement heureuse de t'avoir ma petite sœur !

Presque 5 ans d'écart sur le papier et pourtant si fusionnelles !

Faut dire que j'étais une grande sœur compliante qui jouait encore aux Playmobil® et Barbie® à un âge avancé !

Tu as beau avoir raflé la quasi-totalité de la taille de bonnet de maman et quelques centimètres de plus que moi, je ne t'en veux pas !

Après tout, on est jumelle <3

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABREVIATIONS	9
LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX	10
INTRODUCTION GÉNÉRALE	11
I. Définition, législations, conditions d'accès, indications	11
II. Les différents tests génétiques	15
III. La biopsie embryonnaire	16
ARTICLE ORIGINAL EN COURS DE SOUMISSION	18
I. Introduction	20
II. Matériels et méthodes	22
1) Patients	22
2) Stimulation ovarienne	22
3) Ponction ovocytaire, préparation spermatique, ICSI, culture embryonnaire	22
4) Organisation générale	23
5) Biopsie embryonnaire	24
6) Analyses génétiques, rendu des résultats, transfert, congélation	25
7) Outils statistiques et expression des résultats	26
III. Résultats	27
1) Caractéristiques des patients et des cycles de DPI	27
2) Comparaison des deux stratégies de biopsies embryonnaires	28
3) Issues des cycles avec transfert frais	29
4) Issues des cycles de transfert d'embryons congelés	30
IV. Discussion	32
V. Conclusion	37
VI. Références bibliographiques	38
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES DE L'INTRODUCTION GÉNÉRALE	43
SERMENT D'HIPPOCRATE	47

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABM : Agence de la Biomédecine  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
AMH : Hormone antimüllérienne  
AMP : Assistance médicale à la procréation  
ASRM : American Society of Reproductive Medicine  
BDR : Biologie de la reproduction  
CCNE : Comité Consultatif National d’Ethique  
CCS : Compréhensive Chromosome Screening  
CPDPN : Centre pluridisciplinaire de diagnostic pré-natal  
CGH array : Hybridation génomique comparative  
DPI : Diagnostic pré-implantatoire  
DPN : Diagnostic pré-natal  
ESHRE : European Society of Human Reproduction and Embryology  
FAMA : Fédération d’Activité Médicale Associée  
FISH : Fluorescente in situ hybridization  
FIV : Fécondation *in vitro*  
FSH : Hormone folliculo-stimulante  
GETDPI : Groupe d’étude du DPI en France  
hCG : Hormone chorionique gonadotrope humaine  
HLA : Human Leucocyte Antigen  
HSA : Human Serum Albumins  
IMC : Indice de masse corporelle  
IMG : Interruption médicale de grossesse  
ICMART : International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies  
ICSI : Intracytoplasmic sperm injection  
LH : Hormone lutéinisante  
NGS : Next-generation sequencing  
OATS : oligo-asthéo-térato-spermie  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PCR : Polymerase chain reaction  
PGDIS : Preimplantation Genetic Diagnosis International Society  
PGS : Preimplantation genetic screening  
PGT : Preimplantation genetic testing  
SA : Semaine d’aménorrhée  
SNP array : Single-nucleotide polymorphism array.  
TEC : Transfert d’embryon congelé  
ZP : Zone pellucide

## LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

*Figure 1 : Organisation du laboratoire, choix du jour de la biopsie selon le jour de la ponction.*

*Figure 2 : Schéma d'inclusion.*

*Tableau 1 : Caractéristiques de nos populations. Significativité\*.*

*Tableau 2 : Comparaison des caractéristiques des cycles en fonction du jour de biopsie embryonnaire.*

*Tableau 3 : Issues des cycles avec transfert d'embryon frais en fonction du jour de biopsie embryonnaire.*

*Tableau 4 : Issues des cycles avec transfert d'embryon congelé en fonction du jour de biopsie embryonnaire. Significativité \*.*

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### I. Définition, législations, conditions d'accès, indications

Combinant les progrès technologiques dans les domaines de la médecine, biologie de la reproduction (BDR) et de la génétique clinique, le diagnostic pré-implantatoire (DPI) consiste en la recherche d'une anomalie génétique sur des cellules embryonnaires obtenues par biopsie d'embryons conçus en fécondation *in vitro* (FIV) (1). L'objectif est de transférer dans l'utérus de la patiente et/ou de congeler uniquement les embryons indemnes de la pathologie recherchée. Le DPI peut ainsi être considéré comme une alternative précoce au diagnostic pré-natal (DPN), évitant le recours à l'interruption médicale de grossesse (IMG) ou les fausses couches à répétition dans le cadre des translocations, avec leurs conséquences psychologiques dramatiques (2).

Dès le début, les experts de la discipline ont vite compris l'enjeu de créer des groupes de travail spécialisés dans le domaine du DPI, l'objectif étant de rassembler de manière la plus exhaustive possible l'ensemble des données cliniques disponibles pour évaluer et standardiser les pratiques entre les différents centres (3). Prenant exemple sur les sociétés américaines et internationales, PGDIS (Preimplantation Genetic Diagnosis International Society) et ASRM (American Society of Reproductive Medicine), il a été créé le Consortium de DPI de l'ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) en 1997 à Edimbourg, qui se concertent depuis annuellement pour publier les résultats du DPI à l'échelle des centres européens. Il ressort alors de ces différents rapports, un manque certain d'homogénéité au niveau des législations, des indications et des techniques d'analyses génétiques (4) ; (5). L'état des lieux fait après 10 ans de pratique montre bien la forte hausse d'activité du DPI en Europe tout comme à l'international, avec un nombre croissant de cycles effectués dans de très nombreux centres (27 000 cycles et 5 135 nouveau-nés dans 57 centres) essentiellement grâce à l'apparition de nouvelles technologies d'analyses génétiques (6). Suivant l'évolution de la pratique mondiale, des définitions nouvelles ont été proposées par l'ICMART (International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies) et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé): le Preimplantation Genetic Screening (PGS) est devenu le Preimplantation Genetic Testing (PGT), lui-même divisé en sous-groupes selon l'anomalie recherchée, à savoir le PGT-SR pour les réarrangements structuraux chromosomiques, le PGT-M en cas de mutations à l'origine des maladies monogéniques, le PGT-HLA en cas de typage HLA (Human Leucocyte Antigen) associé et le screening d'aneuploïdie (PGT-A) (7).

En France, la mise en œuvre du DPI s'est avérée nettement plus difficile et restreinte, articulée autour de multiples débats éthiques et confrontée à de nombreuses embûches législatives. Ce fut tout d'abord un refus du Comité Consultatif National d'Éthique (CCNE) qui s'opposait à la réalisation d'expérimentations sur les embryons humains dans le but d'éviter toute dérive eugénique que ces techniques pouvaient encourager (8) . Il aura fallu attendre la loi relative à la bioéthique du 29 juillet 1994 et la mise en application du décret officiel en 1999 pour que les premiers centres français puissent postuler à la pratique du DPI. Les conditions d'accès, ses indications et ses limites sont depuis explicitement définies dans différents textes législatifs spécifiques, tels que le décret du 22 décembre 2006 relatif au diagnostic prénatal et au diagnostic biologique effectué à partir de cellules prélevées sur l'embryon *in vitro* modifiant le code de santé publique, les révisions des lois relatives à la Bioéthique de 2004 et 2011, ainsi que celles à paraître prochainement. La pratique du DPI en France est alors autorisée à titre exceptionnel « aux couples ayant une forte probabilité de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique d'une particulière gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic » (article L.2131-4 du Code de la Santé Publique).

Le DPI peut également concerner des maladies particulièrement invalidantes, à révélations tardives ou mettant en jeu prématurément le pronostic vital. Initié aux Etats-Unis par l'équipe de Verlinsky (9) mais très rarement réalisé en France, le DPI associé à un typage HLA autrement appelé la technique du bébé médicament ou du double espoir, est destiné aux couples ayant donné naissance à un premier enfant porteur d'une maladie génétique grave, et ne pouvant être traitée de manière curative qu'exclusivement par allogreffe de cellules souches ombilicales ou de moelle osseuse de l'enfant né par FIV, indemne et immuno-compatible (article L.2131-4-1 du code de la santé publique).

Les critères réglementaires donnant accès à l'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) doivent aussi être respectés, à savoir un couple composé d'un homme et d'une femme, vivant, en âge de procréer (article L.2141-2 du code de la santé publique). Ils étaient trois centres précurseurs agréés, la Fédération d'Activité Médicale Associée (FAMA) des hôpitaux de Paris et les centres de Strasbourg et Montpellier, qui se sont regroupés au sein du Groupe d'étude du DPI en France (GETDPI). Ils participent également au Consortium Européen du DPI de l'ESHRE. Leurs expériences dans le domaine et premiers résultats publiés ont encouragé la poursuite et la hausse d'activité du DPI en France (10). Ils ont donc plus récemment été rejoints par deux centres supplémentaires (Nantes en 2013 et Grenoble en 2018), ce qui représente aujourd'hui cinq centres au total répartis sur le territoire national, un nombre qui reste toutefois peu significatif à l'échelle européenne et mondiale (11) ; (12). L'Agence de la Biomédecine (ABM) est l'institution nationale responsable de l'encadrement du DPI en France. Elle veille à l'application stricte de la réglementation française dans les centres spécialisés, contribue à l'élaboration des bonnes pratiques et publie les rapports annuels d'activités de

chaque centre disponibles au grand public. Notre centre de DPI au CHU de Nantes a ouvert en 2013 avec un objectif fixé et révisé par l'ABM de 250 cycles démarrés à l'année.

Pour toute demande de prise en charge en DPI, le dossier du couple est étudié par différents professionnels de santé spécialisés au sein d'un Centre Pluridisciplinaire de Diagnostic Pré-Natal (CPDPN) en lien direct avec un centre de DPI agréé et ne sera accepté qu'après validation du bilan féminin et de la faisabilité technique d'un point de vue génétique. En effet, une des conditions essentielles régies par la loi française est que la mutation à l'origine de la pathologie grave, ou bien l'anomalie chromosomique, aient été préalablement identifiées chez l'un des membres du couple ou ascendant(s) direct(s). Il faut ensuite mettre au point l'analyse génétique qui permettra de l'identifier chez l'embryon : c'est une étape délicate qui peut être longue et qui finalement peut s'avérer être un facteur limitant à la prise en charge. Autre point essentiel, les exigences concernant la réserve ovarienne de la patiente sont souvent plus élevées que les couples habituellement engagés dans les procédures de FIV pour cause d'infertilité. Il faudra pratiquer une stimulation hormonale optimale pour obtenir le maximum d'ovocytes, augmenter le nombre d'embryons éligibles au diagnostic génétique et donc potentialiser les chances *in fine* d'en avoir un ou plusieurs sains/équilibrés. Chaque centre de DPI peut fixer ses propres critères d'éligibilité selon la réserve ovarienne de la patiente, il en est de même pour les critères de déclenchement de l'ovulation qui peuvent être assez élevés selon les centres (13). A noter qu'en France, il doit être pris en compte le délai d'attente entre le dépôt de la demande de prise en charge en DPI et la première stimulation débutée, variable d'un centre à l'autre et qui a été estimé à 13,8 mois dans le nôtre en 2018. Ce délai est en adéquation avec les chiffres publiés par l'ABM dans son rapport annuel d'activité en 2018 (14), avec un nombre croissant de demandes à l'échelon national (100 supplémentaires entre 2016 et 2017, soit 12,5% de couples en plus de pris en charge) et des taux d'acceptation toujours élevés (75% en moléculaire et 84% en cytogénétique en 2017).

A l'heure actuelle dans la réglementation française, deux grandes indications sont accessibles au DPI. On parle du DPI génétique ou moléculaire et du DPI cytogénétique ou chromosomique.

Le premier est destiné aux couples atteints d'une maladie monogénique à transmission autosomique dominante, récessive ou liée à l'X. La plupart de ces couples sont fertiles mais la pathologie a été découverte dans le cadre d'une enquête génétique familiale ou après un antécédent personnel d'enfant atteint. Grâce aux progrès techniques croissants et la découverte de nombreuses séquences nucléiques, le nombre de maladies génétiques héréditaires pouvant être identifiées est en constante augmentation. Les plus recherchées en proportion relativement similaire selon les pays sont généralement, la dystrophie myotonique de Steinert et la maladie de Huntington pour les maladies autosomiques dominantes, la mucoviscidose, les hémoglobinopathies de type bêta-thalassémies et l'amyotrophie spinale

pour les maladies récessives, et enfin le syndrome de l'X fragile et la myopathie de Duchenne pour les maladies liées à l'X (6). En France, la liste des maladies accessibles au diagnostic est régulièrement mise à jour par l'ABM qui répertorie l'ensemble des indications pris en charge dans les cinq centres français autorisés. Au total en 2017 sur les plus de 6000 maladies génétiques répertoriées par Orphanet, 283 ont bénéficié d'une prise en charge en DPI avec 38 nouvelles indications (14).

La seconde indication du DPI en France concerne les anomalies chromosomiques structurales. On distingue les translocations réciproques les plus fréquentes (échanges de segments chromosomiques entre deux chromosomes non homologues), des translocations Robertsoniennes (fusion acrocentrique entre deux chromosomes acrocentriques qui sont : 13, 14, 15, 21, 22) et plus rarement les inversions, insertions, délétions et duplications. Les couples ayant recours au DPI dans ce contexte consultent initialement pour infertilité masculine avec découverte d'anomalies sévères sur les paramètres spermatiques (oligo-asthéo-térato-spermie, OATS), ou pour infertilité féminine avec anomalie de la réserve ovarienne ; ou bien encore, l'anomalie est découverte sur les caryotypes réalisés lors d'un bilan de fausses couches spontanées à répétitions, d'échecs d'implantation en FIV ou d'avortements. Les conséquences sur la fertilité et les chances de succès spontanées et en AMP, dépendront du type et de la localisation de la translocation, qui influenceront le pourcentage final post-méiotique de gamètes équilibrées. Le sexe du membre du couple porteur de l'anomalie chromosomique peut également influencer les résultats (15). On estime que la présence d'une translocation chez l'un des membres du couple augmente d'autant plus la prévalence d'aneuploïdie par rapport à la population infertile générale, ce qui pourrait être à l'origine de quasiment 37% des fausses couches spontanées du premier trimestre (16).

A l'international, d'autres indications se sont largement développées mais restent pour l'heure actuelle interdite en France. C'est le cas du screening d'aneuploïdie (recherche des anomalies chromosomiques de nombre : monosomies ou trisomies) rapidement appliqué en routine dans le but d'augmenter les taux de succès en FIV (17) ; (18). Ceci concerne les populations infertiles à risque plus élevé d'aneuploïdie de novo : les couples avec antécédents obstétricaux difficiles, dès lors que l'âge maternel est avancé (> 37 ans), et lorsque l'un des membres du couple est porteur d'une anomalie chromosomique. Le choix du sexe est également possible dans certains centres américains, au Moyen-Orient et en Asie (12).

## II. Les différents tests génétiques

Les techniques d'analyses génétiques ont aussi dû s'adapter et évoluer en parallèle des pratiques grandissantes en DPI et PGT, mais les mises en application de celles-ci divergent selon les pays (19).

Pour le DPI moléculaire, la recherche des mutations à l'origine des maladies monogéniques héréditaires a débuté par le sexage de l'embryon par amplification d'une séquence spécifique d'acide désoxyribonucléique (ADN) préalablement identifiée sur le chromosome Y (20). Puis, il a été possible de détecter directement la séquence spécifiquement impliquée dans la maladie, comme l'a étudié l'équipe de Coutelle pour la mucoviscidose et la dystrophie musculaire de Muchenne (21). La technique utilisée est alors la PCR (Polymerase Chain Reaction) basée sur l'amplification exponentielle *in vitro* de fragments d'ADN spécifiques (appelés des amplicons) par des cycles d'hybridation et de déshybridation successifs, après fixation d'amorces complémentaires. Il est plutôt recommandé la réalisation d'une PCR multiplex qui permet d'amplifier simultanément plusieurs cibles nucléiques spécifiques liées à la maladie recherchée (22). Cependant, plusieurs difficultés peuvent être rencontrées : l'absence d'amplification du locus concerné par la mutation (soit du fait d'une trop faible quantité d'ADN à analyser, soit par l'absence de noyau retrouvé dans la cellule embryonnaire biopsiée), la non-amplification d'un des deux allèles si hétérozygotie (phénomène d'allèle drop-out), ou bien l'amplification préférentielle d'un des deux allèles (23). D'autres sources de contamination peuvent également être dues à la présence de matériel étranger aux cellules embryonnaires, comme par exemple les cellules de la granulosa, les spermatozoïdes, les cellules des manipulateurs extérieurs ou encore des produits de PCR issus d'analyses précédentes (24). Parmi les pistes proposées pour limiter ces risques d'erreurs et/ou de nouvelle biopsie, la technique de micro-injection (IntraCyttoplasmic Sperm Injection ICSI) est systématiquement réalisée en DPI après une décoronisation très minutieuse des ovocytes recueillis.

Lorsqu'il s'agit d'une indication de DPI cytogénétique (et parfois aussi pour les pathologies liées à l'X) la technique historiquement employée est l'hybridation en fluorescence (FISH). La détection de la translocation dans les cellules embryonnaires prélevées est basée sur le compte au microscope des signaux fluorescents émis pendant l'interphase par hybridation de sondes nucléiques spécifiques (24) ; (25), chaque signal correspondant à l'hybridation spécifique d'une sonde dont la couleur dépend du fluorochrome. Il est alors possible de déterminer si l'embryon est équilibré, autrement dit s'il possède l'ensemble du matériel génétique nécessaire, sans pour autant savoir s'il est porteur de la translocation. C'est une technique ciblée uniquement sur l'étude des chromosomes porteurs de l'anomalie recherchée.

Ensuite, les tests ont évolué avec de plus en plus de chromosomes étudiés, l'utilisation de sondes multicolores spécifiques aux points de cassures pour les translocations, puis leur commercialisation à plus grande échelle et à un moindre coût. Enfin, pour pallier aux difficultés liées à l'analyse sur cellule unique, il a été mis en place le dépistage chromosomique complet de l'embryon (Comprehensive Chromosome Screening CCS) qui permet de quantifier les 24 chromosomes en réduisant les temps d'analyses et les risques d'erreur diagnostic (26). Ces nouvelles technologies comprennent l'hybridation génomique comparative (aCGH), l'utilisation des micro-puces à ADN (SNP array) et le séquençage de nouvelle génération à haut débit (NGS), chacune ayant été testée avec leurs propres avantages et inconvénients (27). Aux Etats-Unis, de nombreuses entreprises ont vu le jour sur le marché, spécialisées dans ces analyses génétiques, constituant d'énormes bases de données et réseaux de séquençage pour travailler en collaboration avec les laboratoires de PGS ayant donc adopté la politique de freeze all systématique (28). Dans cette même continuité d'évolution, se sont développés à l'international le DPI-A, la technique de vitrification et les biopsies de trophoctoderme.

### III. La biopsie embryonnaire

Accompagnant historiquement les débuts du DPI, la biopsie était majoritairement réalisée au troisième jour du développement embryonnaire au stade clivé 6 à 8 cellules. Le Professeur Handyside a été le pionnier dans le domaine, ayant contribué à la mise en place de la technique de biopsie de blastomère (29) et à l'origine de la première naissance d'une petite fille indemne de la mucoviscidose (30). D'autres équipes ont suivi avec une augmentation majeure de la pratique du DPI dans le monde, les résultats paraissaient plutôt encourageants (11). Cependant, ceux-ci sont à nuancer selon le nombre de blastomères prélevés par les équipes, comme l'a montré De Vos (31) avec une nette diminution des taux de naissance vivante lorsque 2 cellules sont retirées (22,4% contre 37,4% pour une cellule). Des études ont aussi révélé des taux élevés d'aneuploïdie au stade de l'embryon clivé et une forte prévalence du mosaïcisme dans les blastomères, comparés aux taux retrouvés dans le fragment multicellulaire prélevé dans le trophoctoderme, qui peut atteindre les 60% au stade d'embryon clivé contre 5% seulement dans le blastocyste (32). Ces diverses sources d'erreurs inhérentes au stade de développement embryonnaire associées à la faible quantité cellulaire analysable lors des biopsies de blastomères peuvent donc conduire à des diagnostics erronés aux conséquences graves pour le couple pris en charge.

Ainsi, après la première naissance issue d'une biopsie de trophoctoderme (33), la biopsie embryonnaire à ce stade de développement tardif s'est progressivement imposée, dépassant largement à l'heure actuelle les biopsies de blastomères (34). Les preuves en faveur de la biopsie du trophoctoderme se sont accumulées dans la littérature que ce soit pour sa fiabilité que sa valeur clinique (35) ; (36) ; (37) ; (38) ; (39) ; (40). Parmi les nombreux avantages à réaliser la biopsie à un stade tardif du développement embryonnaire, l'influence de la culture prolongée qui permet de sélectionner les embryons aux meilleures capacités d'implantation avec exclusion des cellules aneuploïdes pendant la compaction embryonnaire, et qui apporte ainsi une rentabilité supérieure à la technique (41). De plus, le prélèvement multicellulaire d'une fraction de trophoctoderme permet d'atténuer l'effet délétère sur la reprise du développement embryonnaire, étant donné que la polarisation et la différenciation de l'embryon ont déjà débuté (42). Le risque de diagnostic non rendu et/ou de re-biopsie est également réduit, tout comme le risque d'échec d'amplification de l'ADN, contrairement à l'analyse sur un ou deux blastomères. Au total, la pratique du DPI-A associée à la réalisation d'une biopsie du trophoctoderme permet d'augmenter le nombre d'embryons euploïdes obtenus en évitant les risques d'erreurs dues au mosaïcisme ; le choix de l'embryon sain/équilibré de top qualité peut se faire en toute sécurité pour l'obtention rapide d'une grossesse unique (43). Bien évidemment, il existe aussi des inconvénients à la pratique d'une biopsie de trophoctoderme, notamment les temps incompressibles de l'analyse génétique (de quelques heures à plusieurs jours, en moyenne 24H) obligeant un transfert à J6 ou le plus souvent, une congélation pour transfert d'embryon dévitrifié sur un prochain cycle. Il est également nécessaire d'adopter toute une organisation spéciale pour effectuer une réévaluation constante du développement des blastocystes en culture et trouver le moment le plus propice pour réaliser la biopsie. De plus, une certaine expérience du laboratoire dans la culture prolongée et la vitrification avec du personnel en nombre et compétent est indispensable (44).

Alors que le DPI-A est actuellement largement pratiqué à travers le monde, avec biopsie de blastocystes et analyses génétiques des 24 chromosomes à haut débit, haute (45), la grande majorité des centres français accrédités à la pratique du DPI pratiquent les biopsies embryonnaires uniquement au stade d'embryon clivé. Une des originalités de notre centre est de réaliser les deux méthodes de biopsie, à J3 et à J5. Notre étude avait donc pour but de déterminer si le jour de la biopsie embryonnaire influençait la prise en charge des couples concernant les taux de naissance vivante principalement. Nous voulions également évaluer l'efficacité de ces deux stratégies, chacune présentant leurs propres avantages et inconvénients, qui sont à prendre en compte pour l'organisation et la coordination entre nos deux laboratoires de médecine, biologie de la reproduction et de génétique.

## ARTICLE ORIGINAL EN COURS DE SOUMISSION

Le Diagnostic Pré-Implantatoire : comparaison des stratégies de biopsie embryonnaire au stade clivé et au stade blastocyste

Pre-implantation Genetic Testing: comparison between cleavage stage and blastocyst biopsy

Julie Bacus<sup>1</sup>, Sophie Loubersac<sup>1,2</sup>, Tiphaine Lefebvre<sup>1</sup>, Florence Leperlier<sup>1</sup>, Paul Barriere<sup>1,2</sup>, Thomas Fréour<sup>1,2</sup>, Arnaud Reignier<sup>1,2</sup>

1 : Service de médecine et biologie du développement et de la reproduction, CHU de Nantes, 38, boulevard Jean-Monnet, 44093 Nantes cedex 1, France

2 : Nantes Université, Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et immunologie, Unité mixte de recherche 1064, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie, F-44000 Nantes, France.

Madame, Monsieur,

Merci de trouver ci-joint notre manuscrit intitulé : « **Le Diagnostic Pré-Implantatoire : comparaison des stratégies de biopsie embryonnaire au stade clivé et au stade blastocyste** », par Bacus et al, que nous soumettons à votre lecture critique dans le but d'une publication en tant qu'article original dans **Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie**.

Cette étude s'est attachée à comparer les issues et caractéristiques des cycles de diagnostic pré-implantatoire en fonction du jour de biopsie embryonnaire. Ce travail a pour originalité d'évaluer la biopsie au stade blastocyste dans le cadre du DPI, pratique encore peu développée en France.

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt et déclarent que ce manuscrit n'a jamais été publié antérieurement, ni encours de soumission dans une autre revue.

Dans l'attente de vos nouvelles,  
Cordialement

Arnaud Reignier  
Médecine et Biologie de la Reproduction  
CHU de Nantes

---

De : Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie <[em@editorialmanager.com](mailto:em@editorialmanager.com)>  
Date : 10 août 2020 18:23  
Objet : Confirmation de reception de votre article Le Diagnostic Pré-Implantatoire: comparaison des stratégies de biopsie embryonnaire aux stades clivé et blastocyste  
À : REIGNIER Arnaud <[Arnaud.REIGNIER@chu-nantes.fr](mailto:Arnaud.REIGNIER@chu-nantes.fr)>

Cher(e) Dr REIGNIER,

Nous avons bien reçu votre article intitulé "Le Diagnostic Pré-Implantatoire: comparaison des stratégies de biopsie embryonnaire aux stades clivé et blastocyste".

Cet article sera rapidement soumis au comité de rédaction de la revue Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie et nous vous ferons parvenir son avis dans les meilleurs délais.

Vous pouvez suivre l'évolution de votre manuscrit en vous connectant en tant qu'auteur sur le site d'EM à l'adresse suivante <https://www.editorialmanager.com/gofs/>.

En vous remerciant de votre confiance,  
Avec nos sentiments les meilleurs,

Le Comité de rédaction de la revue Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie

## I. INTRODUCTION

Le diagnostic pré-implantatoire (DPI) consiste en la recherche d'une anomalie génétique à partir de matériel cellulaire issu d'une biopsie d'un embryon obtenu par fécondation *in vitro*. Seuls les embryons sains ou porteurs hétérozygotes/équilibrés sont transférés ou congelés, pour éviter les lourdes conséquences médicales et psychologiques liées aux fausses couches à répétitions dans le cadre des indications chromosomiques, et diminuer le risque d'interruption médicale de grossesse dans le cadre des maladies monogéniques [1,2]. Le DPI représente ainsi une réelle alternative au diagnostic prénatal (DPN).

Depuis ses débuts dans les années 90 [3] et la première naissance d'une petite fille indemne de mucoviscidose [4], la pratique connaît une très forte croissance à travers le monde [5,6] mais les indications, législations et techniques d'analyses génétiques sont très variables selon les pays [7,8]. Ainsi, plusieurs méthodes ont été différenciées par l'International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) et l'Organisation Mondiale de la Santé [9], appelées DPI-SR pour détecter les déséquilibres et réarrangements chromosomiques, DPI-M pour la recherche des mutations impliquées dans les maladies monogéniques héréditaires, DPI-HLA autrement appelé la technique du « bébé médicament » ou « bébé double espoir » [10] et le DPI-A pour le screening d'aneuploïdie.

En France, la mise en place du DPI en 1999 reste très encadrée législativement. L'Agence de la Biomédecine veille à l'application des recommandations et de la législation au sein des cinq centres français autorisés actuellement pour le DPI, et analyse les activités et résultats de chacun [11]. C'est dans le cadre des lois relatives à la bioéthique de 1994, révisée en 2004 puis en 2011, ainsi que l'application du décret de 2006 relatif au DPN et au diagnostic biologique effectué à partir de cellules biologiques prélevées sur l'embryon *in vitro*, que la pratique du DPI est autorisée à titre exceptionnel pour les couples risquant de transmettre à l'enfant à naître une maladie génétique grave et incurable au moment du diagnostic. Pour toute demande de prise en charge, le dossier clinico-biologique complet du couple est étudié lors d'une réunion de concertation pluridisciplinaire selon des critères d'éligibilité propres à chaque centre. La réserve ovarienne de la patiente doit être suffisante pour obtenir un maximum suffisant d'ovocytes et donc d'embryons à biopsier [12]. La mutation à l'origine de la maladie doit également avoir été préalablement identifiée et la technique d'identification de l'anomalie génétique sur l'embryon doit être réalisable. Deux grands types de DPI existent en France selon l'indication : le DPI moléculaire (DPI-M) et le DPI cytogénétique ou chromosomique (DPI-SR). Le premier est destiné aux couples présentant une maladie monogénique et la technique d'analyse génétique utilisée est la PCR associée au séquençage [13]. Le second concerne essentiellement les anomalies chromosomiques de structure et/ou

de nombre (translocations réciproques ou Robertsonienne mais aussi les inversions, délétions, duplications) et utilise principalement la technique de FISH [14]. Le DPI-A, qui vise à évaluer la ploïdie embryonnaire en analysant sa formule chromosomique, reste interdit en France à ce jour. Cette technique très répandue à l'étranger est associée au développement de nombreuses plateformes génétiques utilisant des micro-puces à ADN (CGH array) ou le séquençage de nouvelle génération (NGS) [15,16].

Quelle que soit l'indication du DPI et la technique envisagée, la biopsie d'une ou plusieurs cellules embryonnaires est indispensable pour la réalisation du diagnostic. Celle-ci peut être réalisée sur l'embryon précoce au 3<sup>ème</sup> jour de développement, ou alors plus tardivement au stade blastocyste où un fragment de trophoctoderme est prélevé. La biopsie de trophoctoderme présente des avantages certains, tels qu'un plus grand nombre de cellules disponibles pour l'analyse génétique, un moindre risque de mosaïques et la sélection d'embryons avec un meilleur potentiel implantatoire qu'au stade clivé, aboutissant au développement rapide de cette technique dans de très nombreux pays avec des résultats cliniques prometteurs [17–20]. Cependant, la mise en place de la biopsie de trophoctoderme a de nombreuses conséquences organisationnelles, à la fois sur l'heure de réalisation de la biopsie que sur la congélation systématique des blastocystes biopsiés dans l'attente des résultats génétiques [21].

En France, la biopsie de blastomères reste quasiment la seule technique pratiquée dans les centres de DPI. Dans notre centre, nous avons pour originalité de réaliser les deux types de biopsies : la biopsie de blastomères au 3<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire (J3) et la biopsie de trophoctoderme au 5<sup>ème</sup> jour (J5). L'objectif de cette étude est de comparer l'efficacité et les résultats cliniques de ces deux stratégies.

## II. MATERIELS ET METHODES

### 1) Patients

Cette étude rétrospective monocentrique a inclus l'ensemble des cycles de DPI réalisés dans notre centre entre 2016 et 2019, quel que soit le rang de la tentative et pour toute indication confondue, cytogénétique et moléculaire. Les cycles avec transferts frais ou avec congélation totale étaient tous inclus dès lors qu'une biopsie embryonnaire avait pu être réalisée. Nous avons également pris en compte les transferts d'embryons congelés issus de ces mêmes cycles de DPI et réalisés sur la même période de 2016 à 2019. Nous avons exclu les cycles de DPI de 2019 pour lesquels les issues de grossesse n'étaient pas encore connues, les cycles où des re-biopsies avaient été nécessaires et les quelques biopsies réalisées à J4 au stade morula. L'ensemble des données cliniques et biologiques nécessaires ont été recueillies dans le logiciel Médifirst et anonymisées. Les patients avaient donné leur accord pour l'utilisation de ces données anonymisées. Deux groupes de comparaison ont été formés selon le jour où avait été effectuée la biopsie embryonnaire : J3 ou J5.

### 2) Stimulation ovarienne

Les patientes recevaient un protocole antagoniste avec comme traitement de stimulation de la FSH recombinante ou des gonadotrophines d'extraction urinaire. Les doses et durées de traitement étaient adaptées à la réserve ovarienne, l'indice de masse corporelle (IMC), l'âge et les éventuels antécédents de prise en charge en AMP de la patiente. Un monitoring échographique et biologique permettait de déclencher l'ovulation par injection d'hormone chorionique gonadotrope humaine lorsque qu'au moins 5 follicules mesuraient au moins 17mm de diamètre.

### 3) Ponction ovocytaire, préparation spermatique, ICSI, culture embryonnaire

La ponction ovocytaire avait lieu par voie transvaginale, échoguidée et au bloc opératoire 36h après le déclenchement. La préparation du sperme frais ou congelé du conjoint par centrifugation sur gradient de silice (Suprasperm, Origio) suivies d'une technique de swim-up ou de lavage simple était réalisée en parallèle pour sélectionner les spermatozoïdes les plus mobiles. Immédiatement après la décoronisation à l'aide de hyaluronidase (SynVibro® hyadase, Origio, Måløv, Denmark) chaque ovocyte mature était micro-injecté, identifié par un numéro unique qui suivait ensuite l'embryon tout au long de la procédure de DPI, puis placés individuellement dans les micro-puits de boîtes de culture (Embryoslide® Vitrolife® Stockholm,

Suède) spécialement adaptées à l'Embryoscope®. Les conditions de culture embryonnaire appliquées étaient les mêmes que celles recommandées en FIV classique [22] soit à 37°C, sous atmosphère réduite en oxygène (5% d'O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub>) et en milieu global sans renouvellement (GTL®, Vitrolife®). Grâce au système time-lapse, l'évaluation de la qualité embryonnaire était basée sur des critères morphologiques et cinétiques à des temps bien définis [23]. Un traitement de soutien de la phase lutéale était prescrit le lendemain de la ponction (progestérone intra-vaginale 200mg deux fois par jour pendant vingt jours) en prévision du transfert embryonnaire.

#### 4) Organisation générale

Les ponctions de DPI étaient programmées les lundi, vendredi et samedi afin que la biopsie embryonnaire au troisième jour de développement puisse être réalisée un jour ouvrable (jeudi, lundi ou mardi respectivement). Les résultats génétiques étaient obtenus le jour même ou le lendemain selon l'indication et le nombre d'embryons analysés, et le transfert intra-utérin de l'embryon indemne de la pathologie était réalisé à J4. Malgré cette bonne coordination entre les différentes équipes, la réponse imprévisible et aléatoire au traitement de stimulation de la patiente entraînait parfois un décalage dans la programmation de la ponction ovocytaire et l'impossibilité de réalisation de la biopsie à J3 (exemple : ponction un jeudi). La biopsie était alors décalée et réalisée au cinquième jour au stade blastocyste. Dans l'attente des résultats génétiques, les embryons biopsiés à J5 étaient immédiatement congelés et le transfert d'embryon décongelé était programmé sur un cycle suivant, sauf dans les rares cas où une analyse cytogénétique rapide était possible le jour même. Les différents cas de figure sont représentés dans la *figure 1*.

LUNDI	MARDI	MERCREDI	JEUDI	VENDREDI	SAMEDI	DIMANCHE	LUNDI	MARDI	MERCREDI
2 PONCTIONS PROGRAMMEES	PAS DE PROG	PAS DE PROG	PAS DE PROG	3 PONCTIONS PROGRAMMEES	2 PONCTIONS PROGRAMMEES	PONCTIONS NR	2 PONCTIONS PROGRAMMEES	PAS DE PROG	PAS DE PROG
ponction			biopsie J3	résultat génétique +/- transfert J4					
				ponction			biopsie J3	résultat génétique +/- transfert J4	
					ponction			biopsie J3	résultat génétique +/- transfert J4

ponction (décalage)	si bio mol →	biopsie J3	congélation avant diagnostic	congélation avant diagnostic	résultat génétique +/- destruction congelés	
	si cyto →	biopsie J3 + résultat génétique	transfert			
ponction (décalage)	si bio mol →	biopsie J5 + congélation			résultat génétique +/- destruction congelés	
	si cyto →	biopsie J5 + résultat génétique +/- transfert				
ponction (décalage)	si bio mol →	biopsie J5 + congélation			résultat génétique +/- destruction congelés	
	si cyto →	biopsie J5 + résultat génétique +/- transfert				

Figure 1: Organisation du laboratoire, choix du jour de la biopsie selon le jour de la ponction.

## 5) Biopsie embryonnaire

Deux opérateurs habilités à la biopsie embryonnaire étaient indispensables. Une double vérification de l'identification des embryons par leurs numéros était effectuée à chaque étape critique. Les embryons qui n'avaient pas présenté des divisions anormales au cours des deux premiers cycles, qui présentaient au minimum six blastomères de tailles homogènes et moins de 25% de fragmentation étaient éligibles à la biopsie à J3. Chaque embryon était placé au maximum dix minutes sous huile dans un milieu de décompaction sans calcium ni magnésium (G-PGD, Vitrolife®) supplémenté au 1/10<sup>ème</sup> avec de l'albumine sérique humaine (HSA, Vitrolife®). Une brèche était réalisée à l'aide d'un laser dans la zone pellucide sous microscope optique (ZilosTK, Hamilton Thorn®, Beverly, MA, USA). La biopsie consistait en l'exercice d'une légère pression sur la zone pellucide permettant l'extrusion d'une ou deux cellules qui étaient directement transmises au laboratoire de génétique concerné selon l'indication pour analyse. Chaque embryon était rincé dans du GTL® puis replacé individuellement dans son puit de culture correspondant à son numéro en attendant les résultats du diagnostic génétique. Pour les biopsies à J5, une brèche par laser dans la zone pellucide était systématiquement réalisée au troisième ou quatrième jour de développement. Les blastocystes candidats à la biopsie devaient présenter une expansion supérieure au stade B2 et une masse cellulaire interne et un trophectoderme notés A ou B selon la classification de Gardner (24). La biopsie était réalisée directement dans une goutte du milieu de culture embryonnaire. Deux techniques

pouvaient alors être pratiquées: soit par aspiration du fragment du trophoctoderme qui commençait à éclore à travers la brèche associée à des impulsions laser aux niveaux des jonctions cellulaires ; soit mécaniquement par frottement/cisaillement entre les pipettes de contention et d'aspiration (flicking) (25).

#### 6) Analyses génétiques, rendu des résultats, transfert, congélation

Pour les DPI cytogénétiques, les cellules étaient lysées avec de l'acide chlorhydrique avant étalement et fixation des noyaux sur une lame de verre et réalisation de la FISH (26). Pour les DPI moléculaires, les cellules étaient directement positionnées sous loupe dans un tampon de lyse permettant l'extraction de l'ADN avant de procéder à la technique d'amplification par PCR (13). Une analyse cytogénétique rapide pouvait être réalisée dans certaines situations et permettait ainsi d'obtenir le diagnostic le jour de la biopsie pour effectuer un transfert immédiat de l'embryon équilibré. A l'inverse, le diagnostic en biologie moléculaire ne pouvait être rendu que le lendemain de la biopsie du fait des différentes étapes et temps techniques incompressibles que demandait la procédure (24h en moyenne). Une fois le statut de l'embryon connu, le transfert d'un ou deux embryons sains/équilibrés ayant repris leur développement de manière satisfaisante était programmé, hormis dans les cas à risque d'hyperstimulation ou de progestéronémie élevée ( $> 1,3\text{ng/mL}$ ) le jour du déclenchement, imposant la congélation de tous les embryons sains. Le nombre d'embryon à transférer était décidé conjointement par le couple et l'équipe médicale. Le transfert était effectué sous contrôle échographique par voie vaginale à l'aide d'un cathéter Cook (Guardia AccessET, Cook®, USA). Un test de grossesse par dosage des bêta-hCG était réalisé onze à douze jours après le transfert intra-utérin puis un suivi échographique permettait de confirmer la présence d'une grossesse clinique. La congélation des embryons sains/équilibrés surnuméraires se faisait au cinquième ou sixième jour de culture embryonnaire par vitrification (RapidVit blast®, Vitrolife®, Kungsbacka, Suède) dans des paillettes de hautes sécurités (Rapid-i, Vitrolife®) selon les mêmes critères morphologiques que ceux appliqués à notre population de FIV, c'est-à-dire les embryons « top » B3-6 AA et les embryons de bonne qualité B3-B6 AB, BA ou B2 (24).

Pour les transferts d'embryons congelés, un traitement hormonal substitutif (œstrogènes et progestérone par voie vaginale) était mis en place pour obtenir une épaisseur endométriale supérieure à 6mm. Les blastocystes étaient décongelés le jour du transfert programmé par ordre de priorité selon leur grade avant biopsie, et seuls ceux montrant des signes de ré-expansion dans les deux heures suivant le réchauffement étaient transférés.

## 7) Outils statistiques et expression des résultats

Les variables qualitatives ont été comparées à l'aide d'un test exact de Fischer, alors que les variables quantitatives l'ont été avec un test t de Student après vérification de la normalité de distribution. Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel BiostaTGV et les graphiques sur Microsoft Excel®. Le degré de significativité acceptable était  $p < 0,05$ .

Notre critère de jugement principal était le taux de naissance vivante, c'est-à-dire le nombre d'enfants nés viables (>500g, >24SA) et indemnes de la pathologie par ponction. Les critères secondaires étaient les taux de grossesse débutante et clinique, de fausse-couche spontanée et de grossesse multiple, toujours exprimés sur le nombre de ponction. Les taux d'implantation étaient calculés comme le nombre de grossesses cliniques par nombre d'embryons transférés. Une grossesse débutante était comptabilisée dès lors que le dosage des béta-hCG était supérieur à 100 mUI/mL. Une grossesse clinique était confirmée par la présence d'au moins un sac gestationnel avec activité cardiaque lors de la première échographie réalisée quatre à six semaines après le transfert embryonnaire. La fausse couche est définie comme une interruption de la grossesse avant 22 semaines d'aménorrhées (SA), sont donc exclus de ce cadre les interruptions volontaires de grossesses. Les taux de grossesse multiple étaient calculés comme le nombre de jumeaux sur le nombre total de grossesses. Le taux d'embryon utile correspondait au nombre d'embryons sains/équilibrés transférés ou congelés sur le nombre total d'embryons biopsiés. Nous avons considéré que les embryons sans diagnostic génétique rendu (non interprétable, non réalisable ou douteux) avaient été biopsiés « inutilement » car n'étaient finalement pas transférables ou congelables. Le taux d'embryon biopsié « inutilement » est donc le nombre d'embryons non utilisables cliniquement sur le nombre total d'embryons biopsiés.

### III. RÉSULTATS

#### 1) Caractéristiques des patients et des cycles de DPI

Au total, 697 cycles ont été inclus dans le groupe des biopsies à J3 et 65 dans le groupe des biopsies à J5 entre 2016 et 2019 (*Figure 2*). Les caractéristiques cliniques et biologiques des deux groupes sont détaillées dans le *tableau 1*.

Les deux groupes étaient comparables statistiquement concernant la plupart des facteurs confondants en AMP, à savoir l'âge de la patiente à la ponction, l'IMC, l'AMH, le type d'infertilité et le tabagisme chez l'un des membres du couple. La majorité des cycles de DPI réalisés avaient une indication moléculaire (56,9%). La biopsie embryonnaire était majoritairement réalisée à J3 quelle que soit l'indication. La biopsie J5 était plus souvent réalisée dans des indications cytogénétiques du fait d'une validation de la technique plus précoce que pour les indications moléculaires.

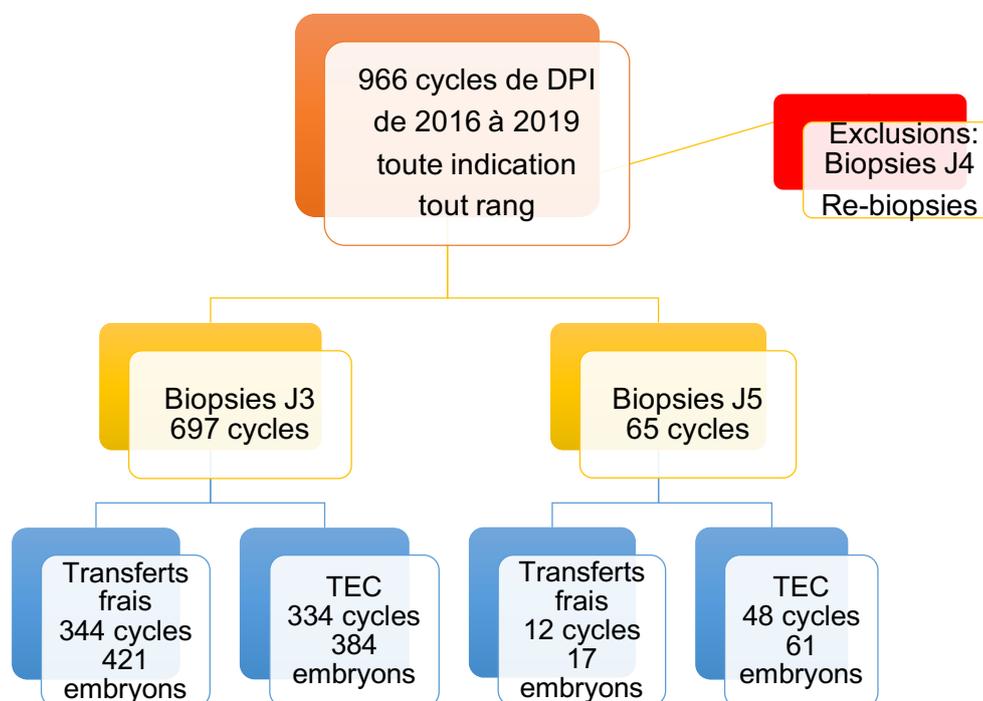


Figure 2 : Schéma d'inclusion.

	Biopsie J3	Biopsie J5	Significativité
<b>Nombre total de cycles (n)</b>	697	65	
<b>Nombre de couples (n)</b>	417	64	
<b>Indication du DPI</b>			
DPI moléculaire (%)	59,6	27,7	<b>p= 7.10-7*</b>
DPI cytogénétique (%)	40,4	72,3	
<b>Age féminin à la ponction (années]</b>	32,8 ± 4,1	32,1 ± 3,8	p= 0,1536
<b>IMC féminin (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23,9 ± 4,7	24,7 ± 5,8	p= 0,2283
<b>AMH (µg/L)</b>	3,5 ± 2,7	3,7 ± 2,8	p= 0,4327
<b>Tabac actif chez les femmes (%)</b>	13,4	9,4	p= 0,4415
<b>Tabac actif chez les hommes (%)</b>	31,1	27,6	p= 0,6573
<b>Type d'infertilité du couple</b>			
Primaire (%)	34,5	37,5	p= 0,6809
Primo-secondaire (%)	25,7	29,7	p= 0,4611
Secondaire (%)	39,8	32,8	p= 0,2877

Tableau 1: Caractéristiques des populations. Significativité\*.

DPI : diagnostic pré-implantatoire    IMC : indice de masse corporelle

AMH : hormone anti-mullerienne

## 2) Comparaison des deux stratégies de biopsies embryonnaires

Au total, 3218 embryons avaient été biopsiés à J3 alors que seulement 276 blastocystes avaient été biopsiés à J5. Le nombre d'ovocytes ponctionnés, injectés et d'embryons obtenus étaient similaires dans les deux groupes (*Tableau 2*).

Les doses de gonadotrophines étaient équivalentes dans nos deux groupes (2295,7 ± 860,3 unités de FSH dans le groupe des biopsies J3 pour 2107,3 ± 802,5 dans le groupe des biopsies J5).

Le nombre d'embryons biopsiés à J3 et à J5 étaient similaires, tout comme le nombre d'embryons diagnostiqués, les taux d'embryons utiles et les taux d'embryons biopsiés inutilement, dans les deux groupes. Enfin, nous avons également calculé le nombre d'embryons biopsiés à J5, qui avaient été congelés immédiatement après (en accord avec notre politique de freeze all dans l'attente des résultats génétiques) mais qui finalement s'étaient avérés atteints ou non diagnostiqués. Il y avait ainsi eu 118 embryons congelés inutilement dans ce cas de figure, ce qui représentait 42,8% parmi l'ensemble des embryons biopsiés à J5. Au contraire parmi les biopsies J3, seuls les embryons sains/équilibrés non transférés étaient congelés vu que leurs statuts génétiques étaient connus à J4. Le taux de cycles avec congélation embryonnaire totale était plus élevé dans le groupe J5 que le groupe J3 (p= 6.10-9).

	Biopsie J3	Biopsie J5	Significativité
<b>Nombre total d'embryons biopsiés</b>	<b>n = 3218</b>	<b>n = 276</b>	
Nombre d'ovocytes ponctionnés	14,6 ± 7	16,3 ± 7	p= 0,0707
Nombre d'ovocytes injectés	11,4 ± 5,8	12,6 ± 5,3	p= 0,0871
Nombre d'embryons obtenus	7,1 ± 4,3	7,9 ± 4,3	p= 0,1418
Nombre d'embryons biopsiés	4,6 ± 3,2	4,2 ± 3,2	p= 0,3696
Nombre d'embryons diagnostiqués	4,3 ± 3,1	3,8 ± 3,1	p= 0,2109
Nombre d'embryons atteints	2,1 ± 2	2,0 ± 2,2	p= 0,9639
Taux d'embryons biopsiés utilement (%)	34 (n= 1095)	37,7 (n= 104)	p= 0,2444
Taux d'embryons biopsiés inutilement (%)	14,9 (n= 481)	11,3 (n= 31)	p= 0,1098
<b>Nombre total de cycles de freeze all (n)</b>	<b>158 (22.7%)</b>	<b>38 (58.5%)</b>	<b>p= 6.10-9*</b>

*Tableau 2 : Comparaison des caractéristiques des cycles en fonction du jour de biopsie embryonnaire*

### 3) Issues des cycles avec transfert frais

Sur les 344 cycles de DPI avec une biopsie J3, 421 embryons avaient été transférés contre seulement 17 embryons sur les 12 cycles avec une biopsie J5. Le nombre moyen d'embryons transférés était similaire (*tableau 3*). Aucune différence significative n'a pu être retrouvée sur notre critère de jugement principal à savoir les taux de naissance vivante, ni pour les critères de jugement secondaires à savoir les taux de grossesse débutante et clinique, les taux d'implantation, les taux de fausse-couche spontanée et les taux de grossesse multiple (*tableau 3*).

	Biopsie J3	Biopsie J5	Significativité
<b>Nombre total de cycles avec transfert frais (n)</b>	344	12	
<b>Nombre d'embryon par transfert</b>	1,2 ± 0,4 (n= 421]	1,4 ± 0,5 (n= 17]	p= 0,2249
<b>Nombre de SET (n)</b>	267	7	p= 0,1568
<b>Nombre de DET (n)</b>	77	5	
<b>Taux d'implantation (%)</b>	21,85 (n= 92]	11,77 (n=2]	p= 0,5454
<b>Taux de grossesse débutante (%)</b>	29,65 (n= 102]	16,66 (n=2]	p= 0,7375
<b>Taux de grossesse clinique (%)</b>	23,26 (n= 80]	16,66 (n=2]	p= 0,7406
<b>Taux de naissance vivante (%)</b>	25,58 (n= 88]	16,66 (n=2]	p= 0,7375
<b>Taux de grossesse multiple (%)</b>	8,82 (n= 9]	0	p= 1
<b>Taux de fausse couche spontanée (%)</b>	4,36 (n= 15]	0	p= 0,1421

*Tableau 3 : Issues des cycles avec transfert d'embryon frais en fonction du jour de biopsie embryonnaire*

SET : transfert d'embryon unique    DET : transfert de deux embryons

#### 4) Issues des cycles de transfert d'embryons congelés

334 cycles de transfert d'embryons congelés (TEC) représentant 384 embryons transférés et qui avaient été biopsiés à J3, contre 48 cycles et 61 embryons transférés biopsiés à J5, ont été inclus (tableau 4). Le nombre d'embryons transférés était similaire dans les deux groupes. Les indications cytogénétiques représentaient 68,75% des cycles pour les embryons transférés après biopsie J5, mais seulement 29,34% dans le groupe biopsie J3 ( $p= 3,5.10^{-7}$ ). Ce résultat concorde avec le nombre supérieur de ponctions avec biopsies J5 suivies d'une congélation totale. Le taux de naissance vivante par transfert était significativement plus faible pour les biopsies J3 que pour les biopsies J5. Cette différence en faveur des biopsies J5 était également observée sur les taux de grossesse débutante et sur les taux de grossesse clinique. Alors qu'aucune grossesse multiple n'avait eu lieu dans le groupe des biopsies J3, 4 accouchements de jumeaux étaient comptabilisés dans le groupe des biopsies J5 (2,22% pour les biopsies J5). Les taux de fausse couche spontanée étaient quant à eux équivalents.

	Biopsie J3	Biopsie J5	Significativité
Nombre total de TEC (n)	334	48	
Indication du DPI			
DPI moléculaire (%)	29,3	68,8	<b>p= 3,5.10-7*</b>
DPI cytogénétique (%)	70,7	31,3	
Nombre d'embryon par transfert	1,2 ± 0,4 (n= 384)	1,3 ± 0,4 (n= 61)	
Nombre de SET (n)	284	35	p= 0,0583
Nombre de DET (n)	50	13	
Taux d'implantation (%)	8,33 (n= 32)	27,87 (n= 17)	<b>p= 0,0006*</b>
Taux de grossesse débutante (%)	18,86 (n= 63)	37,5 (n= 18)	<b>p= 0,0344*</b>
Taux de grossesse clinique (%)	9,28 (n= 31)	27,1 (n= 13)	<b>p= 0,0052*</b>
Taux de naissance vivante (%)	8,98 (n= 30)	35,42 (n= 17)	<b>p= 0,0001*</b>
Taux de grossesse multiple (%)	0	2,22 (n= 4)	<b>p= 0,0018*</b>
Taux de fausse couche spontanée (%)	6,89 (n= 23)	6,25 (n= 3)	p= 1

Tableau 4 : *Issues des cycles avec transfert d'embryon congelé en fonction du jour de biopsie embryonnaire ; Significativité \**.

TEC : transfert d'embryon congelé    DPI : diagnostic pré-implantatoire  
SET : transfert d'embryon unique    DET : transfert de deux embryons

#### IV. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons montré que la biopsie au stade du blastocyste présente des taux de succès cliniques équivalents à la biopsie J3 concernant les transferts frais, mais des taux de succès cliniques supérieurs concernant les transferts d'embryons congelés en DPI. Cependant, la généralisation de cette stratégie de biopsie au stade du blastocyste est difficilement envisageable à l'heure actuelle d'un point de vue organisationnel, technique et économique.

Dans notre étude, le taux de naissance vivante dans le groupe des biopsies J3 était de 26% par transfert frais, cohérent avec le taux moyen d'accouchement par transfert de 30% en France publié par l'ABM en 2018. Concernant les résultats publiés par l'ESHRE [27] avec une majorité de biopsies réalisées sur blastocystes, les taux d'accouchement par embryon transféré se situaient autour des 20% et sont donc proches de notre taux de naissance vivante de 16,7% en transfert frais dans le groupe J5 (sur seulement 12 cycles).

Il est pourtant difficile de comparer nos résultats à ceux de la littérature, les pratiques restant divergentes selon les indications, les techniques et la législation. Ainsi, la plupart des centres internationaux réalisent le DPI-A par biopsie de trophoctoderme en routine dans les cycles de FIV. La généralisation du DPI-A permettrait une augmentation des taux de grossesse clinique en ICSI par transfert frais à 32,9% et à 27% par transferts d'embryons congelés selon les derniers chiffres rapportés par l'ESHRE [28]. La revue de littérature de Mastenbroek [29] n'a initialement pas montré d'amélioration du taux de grossesse grâce au DPI-A, voire même un effet inverse. Les hypothèses avancées étaient, d'une part le nombre restreint de chromosomes analysés par FISH et d'autre part, les taux d'aneuploïdie et de mosaïcisme supérieurs dans l'embryon clivé par rapport au blastocyste. Pour exemple, sur les 1603 embryons analysés par Alder [30], 42% des blastocystes étaient euploïdes contre seulement 24% des embryons clivés. Le mosaïcisme peut varier de 15 à 75% à J3, mais passe de 3 à 24% dans le blastocyste [31]. Il aura donc fallu attendre le développement des techniques de screening du génome entier et la biopsie de blastocyste pour permettre l'obtention de résultats cliniques prometteurs en toute sécurité [32]. Cependant en France, la législation restrictive pour l'exercice du DPI permet de rechercher uniquement l'anomalie préalablement identifiée et causale de la pathologie génétique, et interdit actuellement le recours au DPI-A, empêchant l'évaluation de l'aneuploïdie et du mosaïcisme dans les embryons sains/équilibrés que nous transférons/congelons. Ceci pourrait expliquer nos taux de réussite clinique inférieurs, en plus de la petite taille de notre échantillon de biopsies J5.

Nous réalisons encore aujourd'hui une majorité de biopsies de blastomères à J3, avec moins de 7% des biopsies au stade blastocyste au cours de notre étude, ce qui reste une originalité

par rapport aux autres centres français agréés mais est très faible vis-à-vis des 67% de biopsies de trophoctoderme rapportées par l'ESHRE en Europe en 2017. Pour chaque embryon est choisi le moment le plus opportun au cours de son développement jusqu'au stade blastocyste pour effectuer la biopsie, puis tous les blastocystes biopsiés sont congelés en attendant la transmission des résultats génétiques [25]. Cette organisation nous paraît difficilement applicable, car demandant une synchronisation totale entre les équipes de génétique et de FIV, un turn-over de personnel important, des locaux spécifiquement dédiés à l'activité non jumelée à celle de la FIV classique, représentant *in fine* un coût considérable [33].

En dehors des indications classiques de congélation totale pour progestérone élevée ou syndrome d'hyperstimulation ovarienne, nous congelons des embryons non diagnostiqués dans deux situations : les ponctions réalisées un mardi avec biopsie à J3 le vendredi et blastocystes congelés le dimanche en l'absence de résultat génétique ; et les DPI moléculaires avec biopsie réalisée à J5, étant donné le délai d'attente de 24h pour l'obtention des résultats génétiques. Nous avons donc logiquement retrouvé un pourcentage de cycles avec congélation totale significativement différent dans les deux groupes de biopsie. De plus, nous avons congelé inutilement 118 embryons car atteints ou non diagnostiqués après que la biopsie de trophoctoderme ait été réalisée, ce qui représente 42,8% des embryons totaux biopsiés à J5. Ce cas de figure se présentait moins fréquemment lors des biopsies J3 car les embryons sains/équilibrés étaient d'entrée transférés ou congelés (sauf en cas de ponction le mardi avec biopsie le vendredi). Apparaissant comme argument supplémentaire, cette charge de travail surajoutée au coût conséquent en personnel et en matériel que cette stratégie demande permet difficilement à l'heure actuelle d'envisager sa généralisation dans notre centre.

L'un des autres avantages de retarder le jour de la biopsie serait de « sélectionner » des embryons d'emblée plus compétents avec de meilleures chances d'implantation et de grossesses sachant qu'en moyenne, environ 50% des ovocytes fécondés atteignent le stade blastocyste en FIV [34]. La culture prolongée permettrait donc de diminuer le nombre d'embryons à biopsier en se focalisant sur ceux ayant théoriquement le meilleur potentiel implantatoire. En revanche, le risque d'échec de culture et donc de biopsie pour les femmes ayant une insuffisance ovarienne précoce ou les femmes plus âgées est majoré. Contrairement à Coll [35] qui retrouvait le double d'embryons à biopsier à J3 par rapport au nombre de blastocystes biopsiables, nous n'observons pas de diminution du nombre d'embryons à biopsier au stade blastocyste par rapport au stade de l'embryon clivé et nous n'avons pas non plus biopsié de manière inutile plus d'embryons à J3 que de blastocystes. En revanche, plus de cycles sans transferts ou congélation étaient rencontrés dans le groupe J3 par rapport au groupe J5 (56,39% contre 23,07%,  $p = 7.10^{-7}$ ).

Peu d'études portent sur la comparaison des résultats cliniques selon le jour de biopsie. Coll n'avait pas retrouvé de différence significative au niveau des taux d'implantation et des taux de grossesse clinique (56,1% et 65,3%, 50,3% et 61,4%, respectivement à J3 et J5). Il avait comparé rétrospectivement les résultats de 179 cycles après biopsie J3, analyse sur cellule unique et transfert frais à J5, à ceux de 204 cycles après biopsie de trophoctoderme, screening chromosomique complet et transfert d'embryon congelé puis décongelé [35]. Même si le design de cette étude se rapproche de la nôtre, les enjeux, conditions d'applications et effectifs ne sont pas les mêmes, rendant difficilement comparables nos résultats. D'autre part, dans son essai randomisé prospectif, l'équipe de Scott [36] a formé deux groupes, chacun constituant son propre témoin avec transfert sur le même cycle de deux embryons à la fois, l'un issu d'un parcours de FIV classique et l'autre biopsié à J3 ou à J5, avec strictement les mêmes conditions de culture et le même nombre de manipulations hormis le geste de biopsie pour les deux embryons. Des analyses génétiques postérieures permettaient de savoir quel embryon était à l'origine de la grossesse. En conclusion, la biopsie de trophoctoderme n'avait aucun impact contrairement à la réduction significative de 39% des taux d'implantation et des taux de grossesse qui ressortait entre les embryons biopsiés à J3 des embryons non-biopsiés. Cette même équipe a montré qu'un blastomère représente 13% de la surface totale de l'embryon clivé contre seulement 2 à 3% de celle du blastocyste. Le retrait d'une ou deux cellules pourrait également entraîner un retard dans la compaction et la blastulation, comme la constaté l'équipe de Bar-El [37] grâce au suivi continu de 366 embryons par time-lapse. Appliquant les recommandations de l'ESHRE [38], nous procédons à l'extrusion de deux cellules dès lors que l'embryon en possède huit, une seule si moins de 8. Les analyses cytogénétiques faites sur un blastomère sont confirmées par les résultats obtenus sur le deuxième. Pour les indications de biologie moléculaire, les embryons non transférables/non congelables pour des critères morpho-cinétiques ou suivants leur statut génétique sont systématiquement ré-analysés par PCR. Nous retrouvons ainsi des taux d'implantation corrects pour les embryons biopsiés à J3 (21,9%) par rapport aux 23% publiés par l'ESHRE en 2017. Dans notre étude, le nombre d'embryons biopsiés était similaire à J3 et J5 tout comme le nombre de blastocystes utiles à J5 malgré le prélèvement de deux blastomères à J3. Enfin, le taux de reprise de développement embryonnaire post-biopsie est bon (95,8%) à la fin de l'année 2019. Ces résultats nous prouvent que le jour choisi pour réaliser la biopsie n'a affecté ni la faisabilité de nos tests génétiques ni les taux de succès cliniques. Toujours pour respecter la balance bénéfice-risque du geste de biopsie, les biologistes et techniciens de notre centre ont été habilités après avoir reçu une formation pointilleuse et standardisée ; un programme de maintien des compétences a été mis en place avec suivi des indicateurs de performance individuels. Concernant les biopsies de blastomères, la zone pellucide (ZP) est ouverte à l'aide d'un laser comme recommandé et pratiqué dans la majorité des centres européens [38]. Pour les biopsies de trophoctoderme, la brèche est réalisée au

troisième jour de développement pour faciliter l'éclosion précoce du blastocyste. Ce choix pourrait être remis en cause du fait des inconvénients associés : l'exposition à un stress supplémentaire pour l'embryon par modification du milieu de culture et les manipulations extérieures, l'impossibilité de repérer la position future de la masse cellulaire interne et donc le risque de la léser lors du prélèvement ultérieur [25]. Il est également possible de réaliser l'ouverture de la ZP et la biopsie immédiatement à J5 comme le veut le protocole séquentiel. Le peu d'études comparatives publiées sur la réalisation de la brèche restent contradictoires : Rubino [39] montrait dans son étude rétrospective des différences significatives sur les taux d'implantation, de grossesse clinique et de naissance vivante en faveur du protocole séquentiel (65,3 % contre 55,1 %, 58,4 % contre 46,8 % et 58,9 % contre 46,2 % respectivement,  $p < 0,0001$ ) ; contrairement à l'essai prospectif randomisé de Zhao [40] portant sur 221 cycles qui ne montrait aucune amélioration des taux de succès clinique avec le protocole séquentiel.

Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer les taux de naissance vivante supérieurs retrouvés en cas de transferts d'embryons congelés.

Nos effectifs très réduits dans le groupe des biopsies J5, comportant seulement 12 cycles avec transferts frais, rendent difficilement interprétables les résultats par rapport aux 334 cycles avec transfert frais et biopsie J3. De plus, nous avons significativement plus de cycles de DPI cytogénétique dans le groupe des biopsies J5 que dans le groupe des biopsies J3. Or, il est admis que la présence d'anomalies chromosomiques structurelles chez l'un des membres du couple pourrait être à l'origine d'erreurs lors des processus méiotiques des gamètes parentaux ou lors des divisions mitotiques du zygote, expliquant des taux d'aneuploïdie et de mosaïcisme supérieurs dans les embryons issus de cette population de DPI cytogénétique [41].

Par Ailleurs, Ubaldi [42] a décrit que le choix électif de l'embryon à transférer parmi les embryons euploïdies à l'aide de caractéristiques morpho-cinétiques permettait d'optimiser les chances de grossesse et de diminuer le temps nécessaire à l'obtention de la grossesse. Nous pouvons donc admettre que l'embryon avec la meilleure chance d'implantation future avait été transféré en frais dans le groupe des biopsies J3 alors qu'il avait été congelé puis dévitrifié et transféré sur le prochain cycle dans la majorité des biopsies J5 avec congélation totale, ce qui pourrait expliquer en partie les différences significatives sur nos taux de naissance vivante, grossesse clinique et taux d'implantation dans ces cas de figure.

Par question de praticité pour le laboratoire et facilitation organisationnelle des couples venant de régions souvent éloignées, les transferts frais avaient généralement lieu dès J4 lorsque la biopsie avait été réalisée à J3. Cette stratégie pourrait être discutée, car les critères de sélection embryonnaire à J4 restent peu reconnus et standardisés, même s'il n'est pas démontré de différences significatives sur les taux de succès cliniques entre les transferts de

morulas ou blastocystes [43]. En revanche, aucun transfert à J6 après une biopsie J5 n'était réalisé, l'embryon étant immédiatement vitrifié après vitrification. L'étude prospective sur 221 cycles de Elgindy [44] montrait des taux d'implantation significativement plus élevés à 40% quel que soit le jour du transfert J5 ou J6 pour des blastocystes expansés, alors qu'ils ne dépassaient pas les 19% lors des transferts de blastocystes non expansés à J6. Par la suite, Irani [45] a montré une supériorité clinique des transferts de blastocystes euploïdies congelés à J5 plutôt qu'à J6 appartenant pourtant aux mêmes grades de développements morphologiques. De plus, le phénomène de collapsus décrit comme protecteur avant vitrification, serait entraîné par la réalisation de la brèche suivie de l'éclosion partielle ou totale du blastocyste biopsié, ce qui permettrait alors une exposition et une déshydratation plus uniforme de la blastocèle aux cryoprotecteurs [46]. A ces arguments peut également se rajouter une synchronisation non optimale avec la fenêtre implantatoire suite aux changements morphologiques et moléculaires entraînés par les traitements de stimulation [47] pouvant donc impacter négativement les résultats par transferts frais.

Notre étude présente quelques limites méthodologiques. En effet, son caractère rétrospectif et monocentrique expose à des risques de biais. De même, l'effectif faible dans notre groupe de biopsies J5 constitue une limitation majeure et incite à la prudence quant à l'interprétation des tests statistiques. Cependant, cette étude est originale concernant la pratique française du DPI, étant l'un des seuls centres pratiquant les biopsies de trophoctoderme.

Le futur pourrait résider dans les alternatives à la biopsie embryonnaire, qui reste un geste invasif potentiellement délétère pour la suite de son développement et les chances de succès en DPI. Quelques études se sont penchées sur l'analyse des fragments d'ADN libres issus de l'embryon présents dans le milieu de culture ou dans le liquide blastocoelique [48]. Pour le moment, les résultats publiés ne sont pas suffisamment concluants au vu des faibles taux d'amplification et des risques élevés de contamination par l'ADN maternel [49]. Autre piste évoquée, la prédiction de la ploïdie embryonnaire basée sur la morpho-cinétique. Peu d'études sont disponibles actuellement, hétérogènes et aux résultats contradictoires, ne permettant pas d'établir un modèle déterminant le statut chromosomique de l'embryon selon ses caractéristiques morpho-cinétiques. L'étude rétrospective récente publiée par notre équipe [50] n'a retrouvé aucune différence significative malgré le suivi continu et l'analyse en temps réel par système time-lapse entre les embryons équilibrés et déséquilibrés. Il est donc encore trop tôt pour envisager l'abandon de la biopsie embryonnaire pour la recherche d'anomalies génétiques.

## V. CONCLUSION

Notre étude rétrospective portant sur les quatre dernières années d'activité dans notre centre de DPI nous a permis d'évaluer l'impact de nos deux stratégies de biopsies embryonnaires sur les chances de succès des couples pris en charge, tout en analysant l'efficacité de chacune d'un point de vue praticité et organisationnel. Ainsi, les taux de naissance vivante lors de la réalisation d'un transfert frais embryonnaire n'étaient pas différents quel que soit le jour où avait été effectuée la biopsie. A l'inverse, nous avons obtenu significativement plus de naissances vivantes et de grossesses lorsque la biopsie était réalisée à J5 lors des transferts d'embryon(s) congelé(s). Nos résultats plébiscitent donc la généralisation de la biopsie de trophoblaste dans notre centre alors que nous la réalisons à l'heure actuelle uniquement dans les circonstances exceptionnelles où la biopsie au stade clivé n'est pas possible. D'un point de vue technique, que la biopsie ait eu lieu à J3 ou à J5, nous avons obtenu autant d'embryons utiles, c'est-à-dire d'embryons sains/équilibrés qui avaient pu être transférés ou congelés. Il en était de même pour les embryons biopsiés inutilement car atteints ou non diagnostiqués. Il n'y a donc pas une stratégie plutôt qu'une autre qui nous permet d'effectuer un nombre moindre et optimal de biopsies. Par contre, la proportion des 118 embryons congelés inutilement lorsque la biopsie était réalisée à J5 représente une charge de travail technique considérable, un surcoût financier et matériel au niveau de la place supplémentaire requise pour la cryopréservation, ainsi que la nécessité d'une grande coordination entre les différentes équipes de génétique et biologie de la reproduction. Ces désavantages nous empêchent donc de mettre en place à l'échelle de notre centre, la norme internationale qu'est la biopsie de blastocyste.

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Remerciements : Les auteurs remercient les laboratoires de génétique moléculaire et de cytogénétique du CHU de Nantes pour leur aide dans ce travail.

## VI. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Pergament E. Preimplantation diagnosis: A patient perspective. *Prenatal Diagnosis*. 1991;11(8):493-500.
2. Maxwell SM, Colls P, Hodes-Wertz B, McCulloh DH, McCaffrey C, Wells D, et al. Why do euploid embryos miscarry? A case-control study comparing the rate of aneuploidy within presumed euploid embryos that resulted in miscarriage or live birth using next-generation sequencing. *Fertility and Sterility*. 1 nov 2016;106(6):1414-1419.
3. Handyside AH, Penketh RJA, Winston RML, Pattinson JK, Delhanty JDA, Tuddenham EGD. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *The Lancet*. 18 févr 1989;333(8634):347-9.
4. Handyside AH, Lesko JG, Tarín JJ, Winston RML, Hughes MR. Birth of a Normal Girl after in Vitro Fertilization and Preimplantation Diagnostic Testing for Cystic Fibrosis. *The New England Journal of Medicine*. 24 sept 1992;327(13):905-9.
5. Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Hum Reprod Update*. 1 mai 2012;18(3):234-47.
6. Baruch S, Kaufman D, Hudson KL. Genetic testing of embryos: practices and perspectives of US in vitro fertilization clinics. *Fertility and Sterility*. 1 mai 2008;89(5):1053-8.
7. Harton G, Braude P, Lashwood A, Schmutzler A, Traeger-Synodinos J, Wilton L, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening. *Hum Reprod*. 1 janv 2011;26(1):14-24.
8. Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion. *Fertility and Sterility*. 1 nov 2008;90(5):S136-43.
9. Zegers-Hochschild F, Nygren K-G, Adamson GD, de Mouzon J, Lancaster P, Mansour R, et al. The ICMART glossary on ART terminology. *Hum Reprod*. 1 août 2006;21(8):1968-70.
10. Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C, Kuliev A. Preimplantation Diagnosis for Fanconi Anemia Combined With HLA Matching. *JAMA*. 27 juin 2001;285(24):3130-3.
11. Agence de la biomédecine - rapport médical et scientifique [Internet]. [cité 16 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2017/donnees/diag-prenat/03-preimpl/synthese.htm>
12. Vandervorst M, Staessen C, Sermon K, De Vos A, Van de Velde H, Van Assche E, et al. The Brussels' experience of more than 5 years of clinical preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod Update*. 1 juill 2000;6(4):364-73.

13. Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F, Moutou C, SenGupta S, Traeger-Synodinos J, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Hum Reprod.* 1 janv 2011;26(1):33-40.
14. Harton GL, Harper JC, Coonen E, Pehlivan T, Vesela K, Wilton L. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for fluorescence in situ hybridization-based PGD. *Hum Reprod.* 1 janv 2011;26(1):25-32.
15. Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. *Fertility and Sterility.* 3 sept 2013;100(3):595-602.
16. Dahdouh EM, Balayla J, Audibert F, Wilson RD, Audibert F, Brock J-A, et al. Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada.* mai 2015;37(5):451-63.
17. Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Stavrou D, Jones GM, Cram DS, et al. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia: a pilot study. *Hum Reprod.* 29 janv 2007;22(5):1443-9.
18. Schoolcraft WB, Treff NR, Stevens JM, Ferry K, Katz-Jaffe M, Scott RT. Live birth outcome with trophectoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients. *Fertil Steril.* sept 2011;96(3):638-40.
19. Scott KL, Hong KH, Scott RT. Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing. *Fertil Steril.* sept 2013;100(3):608-14.
20. McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA, Jansen RPS. Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertility and Sterility.* déc 2005;84(6):1628-36.
21. Sullivan-Pyke C, Dokras A. Preimplantation Genetic Screening and Preimplantation Genetic Diagnosis. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America.* mars 2018;45(1):113-25.
22. Wale PL, Gardner DK. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod Update.* 1 janv 2016;22(1):2-22.
23. Rubio I, Galán A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J, et al. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertility and Sterility.* 11 sept 2014;102(5):1287-1294.
24. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and Sterility.* juin 2000;73(6):1155-8.
25. Capalbo A, Romanelli V, Cimadomo D, Girardi L, Stoppa M, Dovere L, et al. Implementing PGD/PGD-A in IVF clinics: considerations for the best laboratory approach and management. *J Assist Reprod Genet.* oct 2016;33(10):1279-86.

26. Griffin DK. Fluorescent in Situ Hybridization for the Diagnosis of Genetic Disease at Postnatal, Prenatal, and Preimplantation Stages. In: Jeon KW, Jarvik J, éditeurs. In Rev Cytol [Internet]. Academic Press; 1994 [cité 12 avr 2020]. p. 1-40. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769608621877>
27. De Rycke M, Goossens V, Kokkali G, Meijer-Hoogeveen M, Coonen E, Moutou C. ESHRE PGD Consortium data collection XIV–XV: cycles from January 2011 to December 2012 with pregnancy follow-up to October 2013. *Hum Reprod.* 1 oct 2017;32(10):1974-94.
28. Moutou C, Goossens V, Coonen E, De Rycke M, Kokkali G, Renwick P, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XII: cycles from January to December 2009 with pregnancy follow-up to October 2010. *Hum Reprod.* mai 2014;29(5):880-903.
29. Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update.* juill 2011;17(4):454-66.
30. Adler A, Lee H-L, McCulloh DH, Ampeloquio E, Clarke-Williams M, Wertz BH, et al. Blastocyst culture selects for euploid embryos: comparison of blastomere and trophectoderm biopsies. *Reproductive BioMedicine Online.* avr 2014;28(4):485-91.
31. Harton GL, Cinnioglu C, Fiorentino F. Current experience concerning mosaic embryos diagnosed during preimplantation genetic screening. *Fertility and Sterility.* mai 2017;107(5):1113-9.
32. Christodoulou C, Dheedene A, Heindryckx B, van Nieuwerburgh F, Deforce D, De Sutter P, et al. Preimplantation genetic diagnosis for chromosomal rearrangements with the use of array comparative genomic hybridization at the blastocyst stage. *Fertility and Sterility.* janv 2017;107(1):212-9.
33. Dahdouh EM, Balayla J, García-Velasco JA. Comprehensive chromosome screening improves embryo selection: a meta-analysis. *Fertility and Sterility.* déc 2015;104(6):1503-12.
34. Yang Z, Zhang J, Salem SA, Liu X, Kuang Y, Salem RD, et al. Selection of competent blastocysts for transfer by combining time-lapse monitoring and array CGH testing for patients undergoing preimplantation genetic screening: a prospective study with sibling oocytes. *BMC Medical Genomics.* 22 juin 2014;7(1):38.
35. Coll L, Parriego M, Boada M, Devesa M, Arroyo G, Rodríguez I, et al. Transition from blastomere to trophectoderm biopsy: comparing two preimplantation genetic testing for aneuploidies strategies. *Zygote.* juin 2018;26(3):191-8.
36. Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertility and Sterility.* sept 2013;100(3):624-30.
37. Bar-El L, Kalma Y, Malcov M, Schwartz T, Raviv S, Cohen T, et al. Blastomere biopsy for PGD delays embryo compaction and blastulation: a time-lapse microscopic analysis. *J Assist Reprod Genet.* nov 2016;33(11):1449-57.

38. Harton GL, Magli MC, Lundin K, Montag M, Lemmen J, Harper JC. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group--best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Human Reproduction*. 1 janv 2011;26(1):41-6.
39. Rubino P, Tapia L, Ruiz de Assin Alonso R, Mazmanian K, Guan L, Dearden L, et al. Trophectoderm biopsy protocols can affect clinical outcomes: time to focus on the blastocyst biopsy technique. *Fertil Steril*. mars 2020;113(5):981-9.
40. Zhao H, Tao W, Li M, Liu H, Wu K, Ma S. Comparison of two protocols of blastocyst biopsy submitted to preimplantation genetic testing for aneuploidies: a randomized controlled trial. *Arch Gynecol Obstet*. mai 2019;299(5):1487-93.
41. Griffin DK, Ogur C. Chromosomal analysis in IVF: just how useful is it? *Reproduction*. juill 2018;156(1):F29-50.
42. Ubaldi FM, Capalbo A, Colamaria S, Ferrero S, Maggiulli R, Vajta G, et al. Reduction of multiple pregnancies in the advanced maternal age population after implementation of an elective single embryo transfer policy coupled with enhanced embryo selection: pre- and post-intervention study. *Hum Reprod*. sept 2015;30(9):2097-106.
43. Li R-S, Hwu Y-M, Lee RK-K, Li S-H, Lin M-H. Day 4 good morula embryo transfer provided compatible live birth rate with day 5 blastocyst embryo in fresh IVF/ET cycles. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. févr 2018;57(1):52-7.
44. E E, Ms E. Day 5 expanded blastocysts transferred on same day have comparable outcome to those left for more extended culture and transferred on day 6. *J Assist Reprod Genet*. juill 2012;29(10):1111-5.
45. Irani M, O'Neill C, Palermo GD, Xu K, Zhang C, Qin X, et al. Blastocyst development rate influences implantation and live birth rates of similarly graded euploid blastocysts. *Fertility and Sterility*. juill 2018;110(1):95-102.
46. Boyard J, Reignier A, Chtourou S, Lefebvre T, Barrière P, Fréour T. Should artificial shrinkage be performed prior to blastocyst vitrification? A systematic review of the literature and meta-analysis. *Hum Fertil (Camb)*. 24 janv 2020;1-9.
47. Evans J, Hannan NJ, Edgell TA, Vollenhoven BJ, Lutjen PJ, Osianlis T, et al. Fresh versus frozen embryo transfer: backing clinical decisions with scientific and clinical evidence. *Hum Reprod Update*. nov 2014;20(6):808-21.
48. Fesahat F, Montazeri F, Hoseini SM. Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*. 26 févr 2020;101723.
49. Brouillet S, Martinez G, Coutton C, Hamamah S. Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review. *Reprod Biomed Online*. juin 2020;40(6):779-96.

50. Lammers J, Reignier A, Splingart C, Moradkhani K, Barrière P, Fréour T.  
Morphokinetic parameters in chromosomal translocation carriers undergoing preimplantation genetic testing. *Reproductive BioMedicine Online*. févr 2019;38(2):177-83.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES DE L'INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Delhanty JDA. Preimplantation diagnosis. *Prenatal Diagnosis*. 1994;14(13):1217-27.
2. Pergament E. Preimplantation diagnosis. A patient perspective. *Prenatal Diagnosis*. 1991;11(8):493-500.
3. Simpson JL, Kuliev A, Rechitsky S. Overview of Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD): Historical Perspective and Future Direction. *Methods Mol Biol*. 2019;1885:23-43.
4. Harton G, Braude P, Lashwood A, Schmutzler A, Traeger-Synodinos J, Wilton L, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening. *Hum Reprod*. 2011 Jan;26(1):14-24.
5. Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion. *Fertility and Sterility*. 2008 Nov;90(5):136-43.
6. Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Hum Reprod Update*. 2012 May;18(3):234-47.
7. Zegers-Hochschild F, Nygren K-G, Adamson GD, De Mouzon J, Lancaster P, Mansour R, et al. The ICMART glossary on ART terminology. *Hum Reprod*. 2006 Aug;21(8):1968-70.
8. Testart J, Sèle B. Towards an efficient medical eugenics: is the desirable always the feasible? *Hum Reprod*. 1995 Dec;10(12):3086-90.
9. Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C, Kuliev A. Preimplantation Diagnosis for Fanconi Anemia Combined With HLA Matching. *JAMA*. 27 juin 2001 Jun 27;285(24):3130-3.
10. Achour-Frydman N, Romana S, Ray P, Hamamah S, Tachdjian G, Munnich A, et al. L'expérience parisienne du diagnostic génétique pré-implantatoire (DPI): bilan des premières naissances. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*. 2008 Mar 9;31(5):456-464.
11. De Rycke M, Goossens V, Kokkali G, Meijer-Hoogeveen M, Coonen E, Moutou C. ESHRE PGD Consortium data collection XIV–XV: cycles from January 2011 to December 2012 with pregnancy follow-up to October 2013. *Hum Reprod*. 2017 Oct;32(10):1974-94.
12. Baruch S, Kaufman D, Hudson KL. Genetic testing of embryos: practices and perspectives of US in vitro fertilization clinics. *Fertility and Sterility*. 2008 May;89(5):1053-8.
13. Vandervorst M, Staessen C, Sermon K, De Vos A, Van de Velde H, Van Assche E, et al. The Brussels' experience of more than 5 years of clinical preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod Update*. 2000 Jul;6(4):364-73.
14. Agence de la biomédecine - rapport médical et scientifique. (page consultée le 16/04/2020). [en ligne]. Disponible sur: <https://www.agencebiomedecine.fr/>
15. Lledó B, Ortiz JA, Morales R, Ten J, De la Fuente PE, García-Ochoa C, et al. The

paternal effect of chromosome translocation carriers observed from meiotic segregation in embryos. *Hum Reprod.* 2010 Jul;25(7):1843-8.

16. Maxwell SM, Colls P, Hodes-Wertz B, McCulloh DH, McCaffrey C, Wells D, et al. Why do euploid embryos miscarry? A case-control study comparing the rate of aneuploidy within presumed euploid embryos that resulted in miscarriage or live birth using next-generation sequencing. *Fertility and Sterility.* 2016 Nov;106(6):1414-1419.

17. Munné S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, et al. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod.* 1999 Sept;14(9):2191-9.

18. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trengia V, Farfalli V, et al. The beneficial effects of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy support extensive clinical application. *Reproductive BioMedicine Online.* 2005 Jan;10(5):633-40.

19. Hardy T. The role of prenatal diagnosis following preimplantation genetic testing for single-gene conditions: A historical overview of evolving technologies and clinical practice. *Prenatal Diagnosis.* 2020 Feb 10; 40(6):647-65.

20. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature.* 1990 Apr;344(6268):768-70.

21. Coutelle C, Williams C, Handyside A, Hardy K, Winston R, Williamson R. Genetic analysis of DNA from single human oocytes: a model for preimplantation diagnosis of cystic fibrosis. *BMJ.* 1989 Jul;299(6690):22-4.

22. Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F, Moutou C, SenGupta S, Traeger-Synodinos J, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Hum Reprod.* 2011 Jan;26(1):33-40.

23. Findlay I, Matthews P, Quirke P. Multiple genetic diagnoses from single cells using multiplex PCR: reliability and allele dropout. *Prenatal Diagnosis.* 1998 Jan 15;18(13):1413-21.

24. Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, Sermon KD, Harper JC. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod.* 2009 Jan 20;24(5):1221-8.

25. Harton GL, Harper JC, Coonen E, Pehlivan T, Vesela K, Wilton L. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for fluorescence in situ hybridization-based PGD. *Hum Reprod.* 2011 Jan;26(1):25-32.

26. Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. *Fertility and Sterility.* 2013 Sep 3;100(3):595-602.

27. Dahdouh EM, Balayla J, Audibert F, Wilson RD, Audibert F, Brock J-A, et al. Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. *Journal of Obstetrics and Gynecology Canada.* 2015 May;37(5):451-63.

28. Sullivan-Pyke C, Dokras A. Preimplantation Genetic Screening and Preimplantation Genetic Diagnosis. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America.* 2018

Mar;45(1):113-25.

29. Handyside AH, Penketh RJA, Winston RML, Pattinson JK, Delhanty JDA, Tuddenham EGD. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *The Lancet*. 1989 Feb 18;333(8634):347-9.
30. Handyside AH, Lesko JG, Tarín JJ, Winston RML, Hughes MR. Birth of a Normal Girl after in Vitro Fertilization and Preimplantation Diagnostic Testing for Cystic Fibrosis. *The New England Journal of Medicine*. 1992 Sep 24;327(13):905-9.
31. De Vos A, Staessen C, De Rycke M, Verpoest W, Haentjens P, Devroey P, et al. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers. *Hum Reprod*. 2009 Sep 19;24(12):2988-96.
32. Capalbo A, Wright G, Elliott T, Ubaldi FM, Rienzi L, Nagy ZP. FISH reanalysis of inner cell mass and trophectoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows high accuracy of diagnosis and no major diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage. *Hum Reprod*. 2013 Jun 5;28(8):2298-307.
33. Kokkali G, Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Jones GM, Cram DS, Stavrou D, et al. Birth of a healthy infant following trophectoderm biopsy from blastocysts for PGD of  $\beta$ -thalassaemia major: Case report. *Hum Reprod*. 2005 May 5;20(7):1855-9.
34. International Federation of Fertility Societies. (page consultée le 16/04/2020). [en ligne]. <https://www.iffsreproduction.org/>
35. Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Stavrou D, Jones GM, Cram DS, et al. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia: a pilot study. *Hum Reprod*. 2007 Jan 29;22(5):1443-9.
36. Schoolcraft WB, Treff NR, Stevens JM, Ferry K, Katz-Jaffe M, Scott RT. Live birth outcome with trophectoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients. *Fertility and Sterility*. 2011 Sep;96(3):638-40.
37. Scott KL, Hong KH, Scott RT. Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing. *Fertil Steril*. 2013 Sep;100(3):608-14.
38. Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, et al. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*. 2013 Sep;100(3):697-703.
39. McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA, Jansen RPS. Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertility and Sterility*. 2005 Dec;84(6):1628-36.
40. McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, Gee AJ, Boer KAD, Jansen RPS. Blastocyst trophectoderm biopsy and preimplantation genetic diagnosis for familial monogenic disorders and chromosomal translocations. *Prenatal Diagnosis*. 2008 Apr 28;28(5):434-42.

41. Barbash-Hazan S, Frumkin T, Malcov M, Yaron Y, Cohen T, Azem F, et al. Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. *Fertility and Sterility*. 2009 Sep;92(3):890-6.
42. Cimadomo D, Capalbo A, Ubaldi FM, Scarica C, Palagiano A, Canipari R, et al. The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. *Biomed Res Int*. 2016 Jan 28;2016.
43. Forman EJ, Hong KH, Ferry KM, Tao X, Taylor D, Levy B, et al. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2013 Jul;100(1):100-107.
44. Capalbo A, Romanelli V, Cimadomo D, Girardi L, Stoppa M, Dovere L, et al. Implementing PGD/PGD-A in IVF clinics: considerations for the best laboratory approach and management. *J Assist Reprod Genet*. 2016 Oct ;33(10):1279-86.
45. Lee E, Illingworth P, Wilton L, Chambers GM. The clinical effectiveness of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in all 24 chromosomes (PGD-A): systematic review. *Hum Reprod*. 2015 Feb;30(2):473-83.

## **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.

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 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.

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 et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement la vie ni ne provoquerai délibérément la mort.

Je préserverai l'indépendance nécessaire et 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 : Le Diagnostic Pré-Implantatoire : comparaison des stratégies de biopsies embryonnaires au stade clivé et au stade blastocyste.**

**Résumé :** Le DPI consiste en la recherche d'une anomalie génétique sur une ou plusieurs cellules issues d'une biopsie d'un embryon, lui-même obtenu par fécondation *in vitro*. Par manque de standardisation, le jour choisi pour réaliser la biopsie embryonnaire varie d'un pays, voire même d'un centre à l'autre. Dans le nôtre, les biopsies sont réalisées préférentiellement sur des embryons clivés à J3 mais également au stade blastocyste. La biopsie J5 demande une congélation quasi systématique de l'embryon avant l'obtention du diagnostic, contrairement à la biopsie J3 qui permet un transfert intra-utérin de l'embryon sain/équilibré à partir du lendemain, ou dès réception des résultats génétiques. Nous voulions comparer les chances de réussite pour les couples pris en charge en DPI dans notre centre selon le jour de la biopsie embryonnaire. Pour cela, nous avons réalisé une étude rétrospective monocentrique incluant tous les cycles de DPI réalisés entre 2016 et 2019 répartis en deux groupes, biopsies J3 ou J5. Aucune différence significative ne ressort des résultats concernant les transferts d'embryons frais. Au contraire, les taux de naissance vivante et de grossesse sont statistiquement supérieurs lorsqu'il s'agit des TEC. Au sujet de l'efficacité des deux stratégies, les taux d'embryons biopsiés utilement et inutilement étaient similaires dans les deux groupes de biopsies. En conclusion, même si nos résultats en termes de naissances sont favorables aux biopsies J5, la généralisation de cette technique dans notre laboratoire comme fait à l'international, nous paraît difficilement envisageable par les nombreuses contraintes organisationnelles et financières que cela impliquerait.

**Mots clés :** Diagnostic pré-implantatoire, DPI, Biopsie embryonnaire, FIV.

---

**Title : Preimplantation Genetic Testing : comparison between cleavage stage and blastocyst biopsy.**

**Abstract :** PGT involves the genetic testing on cells from a biopsy of an embryo obtained by *in vitro* fertilization. There is a lack of standardization about the day chosen to perform the embryo biopsy country to country, even from center to center. In our center, biopsies are preferably performed on day 3 embryos cleaved but also at the blastocyst stage. The biopsy on day 5 requires almost systematically a freeze all before obtaining the diagnosis, unlike the biopsy on day 3 which allows an transfer of the healthy/balanced embryo from the next day or upon receipt of the genetic results. We wanted to compare the chances of success for couples supported in DPI in our center according to the day of the embryo biopsy. To achieve this, we carried out a retrospective monocentric study including all DPI cycles carried out between 2016 and 2019 divided into two groups, biopsies day 3 or 5. No significant difference emerges from the results concerning fresh embryo transfers. On the contrary, the rates of live birth and pregnancy are statistically higher when it comes to thawed embryo transfers. Regarding the efficiency of the two strategies, the rates of usefully and unnecessarily biopsied embryos were similar in the two groups of biopsies. In conclusion, even if our results in terms of births are favorable to biopsies on day 5, the generalization of this technique in our laboratory as done internationally seems hardly possible due to the many organizational and financial constraints that this would imply.

**Keywords :** Preimplantation Genetic Testing, PGT, Embryo biopsy, IVF.

---