



HAL
open science

Morpho-cinétique embryonnaire préimplantatoire et issues cliniques après micro-injection de spermatozoïdes chirurgicaux

Thomas Molher

► **To cite this version:**

Thomas Molher. Morpho-cinétique embryonnaire préimplantatoire et issues cliniques après micro-injection de spermatozoïdes chirurgicaux. Médecine humaine et pathologie. 2020. dumas-03635361

HAL Id: dumas-03635361

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03635361v1>

Submitted on 8 Apr 2022

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'État de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

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

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

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

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

UNIVERSITÉ DE PARIS

Faculté de Santé

UFR de Médecine

Année 2020

N° 175

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le : 23 octobre 2020

Par

Thomas MOLHER

Morpho-cinétique embryonnaire préimplantatoire et issues cliniques après micro-injection de spermatozoïdes chirurgicaux

Dirigée par Mme la Docteure Johanna Lousqui

JURY

Mme la Professeure Nelly Frydman

Présidente

M. le Professeur Jean-François Hermieu

Membre du jury

M. le Professeur Didier Borderie

Membre du jury

Mme la Docteure Maëliiss Peigne

Membre du jury

Mme la Docteure Johanna Lousqui

Directrice

M. le Docteur Xavier Ferraretto

Membre du jury

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont soutenu, encadré, aidé, orienté, conseillé durant cet internat. J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs et docteurs qui, par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils, leurs critiques ont guidé mes réflexions et mes choix.

Je remercie tout d'abord toute l'équipe du centre d'AMP de l'hôpital Bichat qui m'a fourni tous les outils nécessaires à l'entrée dans le monde rigoureux de l'AMP. Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans votre générosité, votre disponibilité et votre écoute.

Je tiens à remercier spécialement ma directrice de thèse, le docteur **Johanna LOUSQUI**, pour sa patience et sa disponibilité sans faille, qui est à l'origine de ce sujet de thèse aussi excitant qu'intéressant. J'adore notre complicité et notre entente n'aura connu aucune faille. Une reconnaissance toute particulière pour les docteurs **Xavier FERRARETTO** et **Marie-Astrid LLABADOR** ainsi que pour le professeur **Florence EUSTACHE** pour leurs soutiens et leurs engagements remarquables dans ma formation et sans qui ce travail n'aurait pu être mené à bien. Aujourd'hui je regarde ces douze mois passés avec vous avec nostalgie car les souvenirs que nous partageons resteront parmi les plus beaux de mon internat. C'est toujours un bonheur de revenir vous voir et j'espère que les liens d'amitié qui nous unissent resteront toujours intenses.

Je remercie également chaleureusement le Professeur **Nelly FRYDMAN** pour avoir accepté de présider ce jury. Merci pour tous ces précieux conseils qui ont toujours contribué à alimenter ma réflexion et pour votre soutien pédagogique exemplaire et ce, dès notre premier entretien il y a 2 ans, m'entrouvrant les portes de la discipline.

Un remerciement particulier au Professeur **Jean-François HERMIEU** d'avoir accepté d'être dans ce jury et avec qui j'ai eu l'immense plaisir de travailler et sans qui, techniquement, ce sujet de thèse ne pourrait exister. Je suis très fier d'avoir pu collaborer avec vous durant 12 mois.

Une grande reconnaissance au Professeur **Didier BORDERIE** d'avoir accepté sans hésitation l'invitation à rejoindre ce jury alors que nous n'avions que très peu échangé auparavant et

probablement pas sans la crise sanitaire du début d'année. Sachez que je suis très heureux d'avoir pu vous aider en ces temps difficiles.

Également, un profond merci au docteur **Maëliiss PEIGNE** d'avoir toujours été d'une grande bienveillance et encore plus aujourd'hui, pour avoir accepté sans attendre de nous rejoindre afin que ma soutenance puisse voir le jour dans les meilleurs délais.

Une dernière pensée pour mon co-interne, **Edouard SEZIONALE**, avec qui j'ai partagé 1 an et demi d'AMP mais surtout plus de 10 ans de médecine chargés de souvenirs mémorables depuis notre première rencontre au weekend d'intégration de P2.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagné tout au long de ces années parfois difficiles. Un formidable merci à mes parents pour leur soutien moral et matériel ainsi que pour leur confiance indéfectible dans mes choix. Enfin une pensée vraiment spéciale pour celle qui partage ma vie et donc mon caractère, merci pour ta présence et ton soutien inépuisable ainsi que pour ton enthousiasme contagieux à l'égard de mes projets comme dans la vie en général.

Table des matières

<u>REMERCIEMENTS</u>	<u>2</u>
<u>INTRODUCTION.....</u>	<u>5</u>
<u>MATERIELS ET METHODE.....</u>	<u>9</u>
DESIGN DE L'ETUDE	9
STIMULATION OVARIENNE	10
MICRO-INJECTION, CULTURE ET TRANSFERT EMBRYONNAIRE	10
PRELEVEMENT TESTICULAIRE ET EPIDIDYMAIRE	11
ANALYSE EN TIME LAPSE ET EVALUATION EMBRYONNAIRE	12
ANALYSE STATISTIQUE	13
<u>RESULTATS</u>	<u>14</u>
<u>DISCUSSION</u>	<u>18</u>
<u>CONCLUSION.....</u>	<u>23</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>24</u>
<u>ANNEXE 1</u>	<u>29</u>
<u>ANNEXE 2</u>	<u>30</u>
<u>ANNEXE 3</u>	<u>31</u>
<u>ANNEXE 4</u>	<u>32</u>
<u>ANNEXE 5</u>	<u>33</u>
<u>ANNEXE 6</u>	<u>34</u>

Introduction

L'assistance médicale à la procréation a énormément évolué ces 20 dernières années avec le développement et la mise au point des techniques de micromanipulation comme l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI). Les hommes présentant de sévères altérations des paramètres spermatiques, notamment l'absence totale de spermatozoïde dans l'éjaculat après centrifugation (azoospermie), représentent environ 10% des infertilités masculines. Grâce à l'ICSI et au prélèvement chirurgical de spermatozoïdes, certains de ces patients ont pu voir se concrétiser leur projet parental grâce à une prise en charge en AMP intraconjugale.

Les causes sous-jacentes de ces infertilités masculines sont variées, influençant probablement la sévérité des altérations. Elles peuvent être génétiques : les délétions spécifiques du bras long du chromosome Y connues comme la région AZF, sont cliniquement importantes car elles sont associées avec une perturbation ou un échec de la spermatogénèse(1,2). Dans 15 à 20% des cas ces microdélétions sont associées à une azoospermie ou à une oligozoospermie.

Parmi les hommes présentant une azoospermie, 10 à 20% sont porteurs d'une anomalie chromosomique au caryotype. Les anomalies de structure sont, quant à elles, 10 fois plus fréquentes chez les hommes infertiles que dans la population générale ; comme par exemple, l'inversion du chromosome 9 présent dans 3 à 5% des cas(3).

Des causes obstructives, séquellaires infectieuses ou génétiques comme l'atrésie congénitale des canaux déférents, souvent associée à une mutation du gène CFTR, peuvent être responsables d'azoospermie sans pour autant perturber la spermatogénèse.

D'autres causes d'azoospermie peuvent être liées à des perturbations endocrines, des facteurs environnementaux, des causes vasculaires ou encore une exposition chimique.

Les azoospermies non obstructives (NOA) résultent d'étiologies sécrétoires, donc d'un défaut de la production testiculaire, et constituent ainsi une indication préférentielle à l'extraction testiculaire de sperme (TESE)(4). *A contrario*, des azoospermies obstructives, qui résultent d'une obstruction ou d'une absence de voie éjaculatoire, et présentent une dilatation épидидymaire consécutive à l'accumulation des spermatozoïdes en amont des voies excrétrices alors éligibles à une aspiration microchirurgicale épидидymaire (MESA)(5,6).

La probabilité théorique de retrouver des spermatozoïdes utilisables en ICSI est d'environ 50% mais reste très variable en pratique clinique. Selon les études, elle semble dépendre de certains facteurs prédictifs du bilan étiologique(7–10).

La qualité des spermatozoïdes récupérés, et notamment leur capacité fécondante (mobilité, maturité) semble corrélée à la technique chirurgicale d'extraction(11). Aujourd'hui, plusieurs études indiquent que l'origine du spermatozoïde peut être associée à la qualité embryonnaire(12). Certains auteurs rapportent des taux de fécondation et de grossesses satisfaisants en utilisant des spermatozoïdes testiculaires(13–15). Néanmoins, ces taux restent plus faibles dans la littérature, pour les spermatozoïdes testiculaires en regard des spermatozoïdes éjaculés et épидидymaires(16–18).

Appréhender les causes d'échecs de la prise en charge en AMP constitue un point central pour l'ensemble des acteurs de la médecine de la reproduction. Le potentiel mitotique et la syngamie nucléaire, deux phénomènes essentiels au développement embryonnaire, sont hérités du spermatozoïde. La bonne formation du sperme suivi de la fusion des pronucléi sont des étapes critiques dans le processus de fécondation. Le centrosome doit répliquer, se diviser et organiser la formation du fuseau mitotique nécessaire aux futurs clivages cellulaires(19,20). Le spermatozoïde apporte également un facteur d'activation ovocytaire responsable d'oscillations calciques menant à l'initiation du cycle mitotique(21). La contribution paternelle joue aussi un rôle plus tardif, dans l'activation du génome embryonnaire et dans le processus menant à la blastulation(12,22,23).

L'évaluation du développement embryonnaire ainsi que la sélection de l'embryon à transférer présentant les meilleures chances d'implantation et le meilleur pronostic en termes de naissance vivante constituent un enjeu majeur pour le biologiste de la reproduction. Le développement embryonnaire *in vitro* implique un monitoring permanent des facteurs extrinsèques comme le pH ou la température dont les variations dans le milieu de culture affecteront le développement embryonnaire(24). Le système de culture a un impact certain sur ces fluctuations(25–27), notamment lorsque les manipulations d'embryons deviennent répétitives ou que la stabilité du milieu est compromise par l'ouverture et la fermeture itératives des incubateurs.

Depuis quelques années, l'apparition d'une nouvelle génération d'incubateurs « Time lapse Imaging System » a permis l'observation des embryons sans leur manipulation et ainsi, de minimiser les variations du milieu de culture (28,29). Dans ces incubateurs, l'embryon est

monitored pendant l'ensemble de sa période d'incubation grâce à l'acquisition d'images à intervalle de temps régulier de l'ordre d'une quinzaine de minutes aux différents plans de l'embryon afin d'obtenir une reconstitution spatiale vidéo. Ainsi, au lieu d'une évaluation morphologique statique à un temps précis, le biologiste peut réaliser une évaluation dynamique et apprécier l'évaluation morpho-cinétique de l'embryon en temps réel.

L'intégration de l'imagerie « time lapse » permet une analyse plus performante qu'avec les checkpoints conventionnels de 18, 42, 66, 90 et 114 h après fécondation.

L'évaluation quantitative et qualitative de l'influence du spermatozoïde sur les cycles cellulaires embryonnaires nous permettrait de mieux appréhender l'effet paternel sur le développement préimplantatoire. Peu d'études ont, à ce jour, porté sur l'influence de l'origine spermatique.

L'apparition de cette technologie a mis en avant l'analyse morpho-cinétique des cycles cellulaires dans l'évaluation de la viabilité et de la capacité implantatoire des embryons. De récentes études ont montré une association entre les timings des clivages cellulaires et l'implantation(30). Ces systèmes permettent donc d'évaluer tout changement morphologique de l'embryon et ainsi sélectionner celui qui possède les caractéristiques morpho-cinétiques optimales pour un transfert ou une vitrification.

Certaines études montrent une augmentation de 15 à 20% des grossesses cliniques associées à cette sélection embryonnaire(28,29). Beaucoup d'autres se sont attachées à déterminer une signification dans les différences des clivages cellulaires(31). En 2011, *Meseguer et al*(28) ont mis en évidence que les timings précoces des premières divisions cellulaires constituaient des indicateurs performants des chances d'implantation et ont développé un algorithme permettant de sélectionner l'embryon à transférer associé aux meilleures chances d'implantation et de naissance vivante.

A ce jour, il n'existe que peu d'études évaluant les paramètres morpho-cinétique des embryons conçus avec des spermatozoïdes chirurgicaux(32–34). Ainsi, l'objectif de cette étude est de déterminer s'il existe une association entre l'origine du spermatozoïde et les paramètres morpho-cinétiques, les anomalies de clivage embryonnaires préimplantatoires et les issues cliniques du transfert de ces embryons.

Matériels et méthode

Design de l'étude

Nous avons mené une étude rétrospective du 1^{er} janvier 2016 au 31 octobre 2019 à l'hôpital Bichat. Un total de 83 cycles de fécondation *in vitro* avec micro-injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI) représentant 70 couples ont été analysés.

Ainsi, ont été inclus les couples dont les femmes avaient moins de 38 ans avec des profils hormonaux sans particularité (AMH > 1 ng/ml, FSH < 12UI/l, E2 < 60 pg/ml) et qui ne présentaient pas de facteur identifié d'infertilité ; excepté une indication tubaire stricte. Les femmes avec moins de 5 ovocytes retrouvés à la ponction ont été exclues de l'étude, tout comme, les hommes présentant une infertilité d'origine génétique au caryotype ou une micro-délétion de la région AZF du bras long du chromosome Y.

Trois groupes ont été constitués selon l'origine du spermatozoïde utilisé lors de la micro-injection :

- spermatozoïde testiculaire (ST),
- spermatozoïde épидидymaire (SE)
- et un groupe contrôle, spermatozoïde éjaculé (SC) possédant des altérations légères à modérées de la concentration spermatisques (>5 M/ml) mis en évidence sur les spermogrammes réalisés en amont de la tentative en accord avec les recommandations WHO (2010).

Le groupe d'étude incluait des patients présentant une azoospermie au profil obstructif ou non obstructif ayant bénéficié d'une TESE ou une MESA. Des profils hormonaux et échographiques ont été réalisés pour tous ces hommes. Le groupe contrôle est constitué d'hommes infertiles présentant une indication d'ICSI.

Les embryons étaient placés dans l'EmbryoScope© (Vitrolife) et l'analyse morphocinétique a été réalisée à partir du logiciel EmbryoViewer© (Vitrolife).

Stimulation ovarienne

Le protocole de stimulation était choisi en fonction de l'âge de la patiente, de son profil hormonal (E2, FSH, AMH), de son compte folliculaire antral (CFA) et des précédentes réponses aux gonadotrophines. Le blocage de l'axe hypothalamo-hypophysaire était réalisé avec un agoniste ou un antagoniste de la GNRH. De la FSH recombinante était utilisée pour la stimulation ovarienne. L'ovulation était déclenchée par HCG et/ou GnRH quand il y avait au moins trois follicules de 17 mm de diamètre à l'échographie. Les complexes cumulo-ovocytaires étaient récupérés 35 à 36h plus tard par aspiration trans-vaginale sous contrôle échographique et placés deux heures dans de l'IVF pré-équilibrée à 37°C avec 5.5% de CO₂ avant la micro-injection.

Micro-injection, culture et transfert embryonnaire

La décoronisation des cellules du cumulus était réalisée par digestion enzymatique grâce à de la hyaluronidase dilué à 20% (40IU/ml).

Des gradients de densité conventionnels ont été utilisés pour isoler les spermatozoïdes du groupe contrôle. Les spermogrammes ont été réalisés selon les recommandations WHO (2010).

Pour l'ICSI, les spermatozoïdes étaient placés dans du polyvinylpyrrolidone (PVP) et choisis morphologiquement à l'objectif x40. Les ovocytes matures en métaphase II étaient positionnés dans du FertiCult®(avec HEPES), puis après micro-injection, placés individuellement dans les puits des boîtes d'EmbryoSlide® (Vitrolife) pré-équilibrés la veille et contenant un milieu de culture continue CSC® (Irvine) recouvert d'huile de lavage Ovoil®. Ces boîtes étaient placées dans les chambres individuelles de l'EmbryoScope® pour une mise en culture de 5 à 6 jours à 37°C sous 5.5% de CO₂ et 5% O₂.

La fécondation des ovocytes était contrôlée entre la 16^{ème} et la 18^{ème} heures post injection.

Le jour du transfert ainsi que le nombre d'embryon à replacer étaient déterminés après confrontation des arguments clinico-biologiques (qualité et quantité de la cohorte embryonnaire, parcours AMP antérieur, antécédents gynéco-obstétriques de la patiente). Les transferts étaient réalisés sous contrôle échographique. Les embryons surnuméraires non

transférés étaient conservés jusqu'à J5/J6 pour une éventuelle vitrification. Les dosages d'hCG étaient effectués 14 jours après le transfert. Les grossesses cliniques étaient confirmées par la présence d'un sac gestationnel avec une activité cardiaque.

Prélèvements testiculaires et épидидymaires

L'extraction chirurgicale des spermatozoïdes testiculaires était réalisée selon le protocole d'extraction TESE. Après ouverture scrotale, la vaginal était identifiée et incisée afin de mettre en évidence le testicule. Une petite incision verticale était réalisée dans l'albuginé et une légère pression testiculaire appliquée afin de créer une invagination des tubes séminifères. Cette procédure était répétée sur le testicule controlatéral systématiquement.

Les spermatozoïdes épидидymaires étaient récupérés par voie chirurgicale par aspiration épидидymaire selon le protocole MESA. Dans ce cas, un contrôle microscopique par le biologiste responsable du traitement et de la congélation éventuelle était réalisé directement au bloc opératoire afin de guider un éventuel geste complémentaire.

Les prélèvements étaient placés dans un tube Eppendorf® contenant du FertiCult® (avec HEPES) le temps de l'acheminement au laboratoire pour dissection, évaluation et congélation. Les prélèvements testiculaires étaient lavés dans de l'IVF pré-équilibré et seulement 20 à 25 µl de l'échantillon étaient utilisés pour l'évaluation de la mobilité, la vitalité et de la concentration spermatique. Le traitement des échantillons récupérés était réalisé conformément au protocole d'extraction des spermatozoïdes testiculaires du laboratoire : un premier temps consacré à une décantation de 3 heures pour favoriser la libération des spermatozoïdes hors des tubes et éliminer les débris cellulaires puis un second temps de lavage du prélèvement. La préparation destinée à la congélation était diluée au 1/2 avec du SpermFreeze® (Irvine) et montée dans des paillettes. Ces paillettes étaient ensuite congelées via une technique de congélation lente automatisée Planer®. Tous les prélèvements chirurgicaux étaient effectués et congelés avant la planification des cycles d'ICSI. Le jour de la ponction, les paillettes étaient réchauffées à température ambiante et un lavage avec un gradient de faible volume (500 µl de P45) était réalisé.

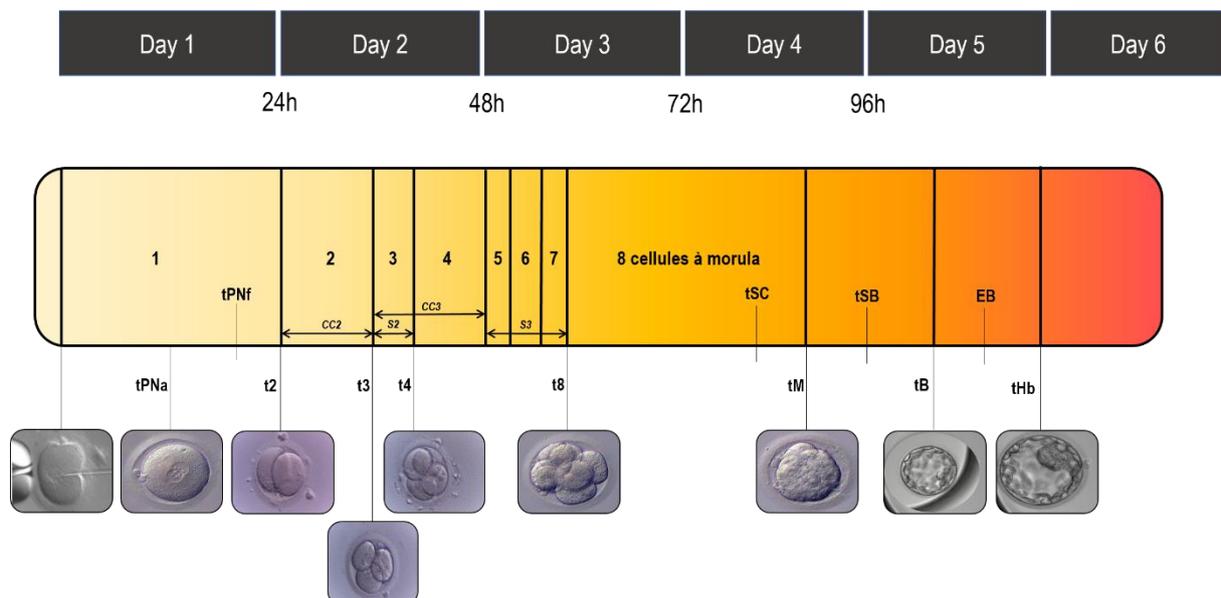
Analyse en time lapse et évaluation embryonnaire

Le système d'acquisition « time lapse » était paramétré pour permettre une acquisition d'image à fort grossissement (x200) et sur 7 plans focaux différents toutes les 15 minutes pendant la culture. L'évaluation morpho-cinétique de chaque embryon a été réalisée rétrospectivement par le même opérateur et de façon standardisée. Une évaluation du nombre de cellules, du pourcentage de fragmentation et de la symétrie des blastomères selon la classification d'Istanbul (2011) était effectuée ainsi qu'une analyse des anomalies de clivages(35). Seuls les clivages directs du premier, deuxième et troisième cycle cellulaire étaient pris en compte.

Les embryons étaient classés en compaction (SC) dès les premiers signes de disparition des limites cellulaires et en morula (tM) lorsque cette fusion concernait 90% des cellules. Les évènements de clivages sont exprimés en Heure post injection, avec l'ICSI comme t0. Les timings à 2 cellules t2, t3, t4, t5, t8, t9, les timings de compaction (tSC), morula (tM), début de blastulation (SB), blastocyste (tBL) et d'expansion (tEB) ont été déterminés selon les recommandations méthodologiques(36)(Annexe 1).

Les intervalles, t3-t2, t4-t3, t5-t3 correspondants aux cycles cellulaires embryonnaires (cc2, S2, cc3) ont été calculés et les intervalles optimaux caractérisant les embryons à haut potentiel implantatoire ont été définis selon des publications antérieures(29,37,38). Les valeurs suivantes ont été utilisées comme référence; t3-t2 (>5 et <12h), t4-t3 (<1h), t5 (45-57h), t5-t3 (9.7-21h), tSB (<96.2h) et tEB (<116h).

Figure 1 : chronologie dynamique des annotations en time lapse



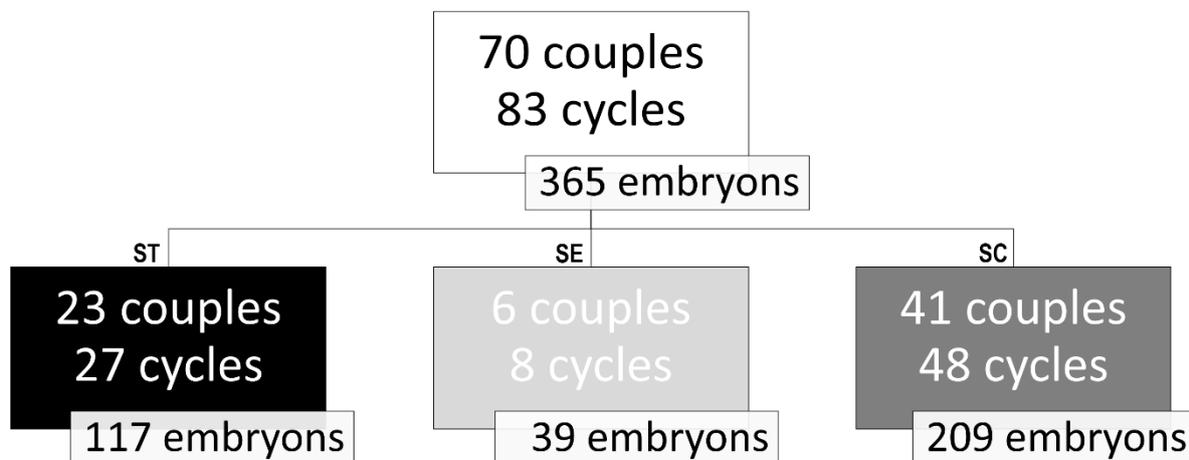
Analyse statistique

Pour l'analyse des variables qualitatives, un test du X^2 a été réalisé et pour l'analyse des variables quantitatives, un test non paramétrique de Mann-Whitney après avoir vérifié que nos données ne suivaient pas une distribution normale. Un $p < 0,05$ était considéré comme statistiquement significatif.

Résultats

Un total de 70 couples représentant 83 cycles d'ICSI ont été inclus dans cette étude. Une extraction chirurgicale de spermatozoïdes testiculaires (n=23) et épидидymaires (n=6) a été réalisée pour 35 cycles d'ICSI. Quarante-huit cycles ont été réalisés à partir d'éjaculats frais dont la concentration spermatique était supérieure à 5 M/ml. Les patients présentant des anomalies du caryotype ou des microdélétions sur le chromosome Y ont été exclus. Seuls les couples dont les femmes avaient moins de 38 ans et qui ne présentaient pas de facteur identifié d'infertilité ; excepté une indication tubaire stricte, ont été inclus.

Figure 2 : Répartition des couples, des cycles d'ICSI et du nombre d'embryons à 2 pronucléi dans les groupes testiculaire (ST), épидидymaire (SE) et contrôle (SC)



Les informations cliniques et biologiques sont détaillées dans l'annexe 2. L'âge était comparable entre les 3 groupes. Également, le nombre d'ovocytes collectés et le nombre d'ovocytes matures par patient était comparables entre les groupes. Les taux de fécondation, ne présentaient pas de différence significative, malgré un taux de fécondation moins bon pour le groupe contrôle (64,2% vs 69,3% et 68,1%). La moyenne d'embryon transféré était semblable entre les groupes et 95 embryons ont été transférés, 55 issus de spermatozoïdes

éjaculés, 31 issus de spermatozoïdes testiculaires et 9 issus de spermatozoïdes épидидymaires. Les taux d'implantation étaient comparables avec 23,6% pour le groupe SC, 22,6% pour le groupe ST et enfin 22,2% pour le groupe SE. Les taux de naissances vivantes étaient comparables entre les groupes avec cependant une diminution non significative du taux de naissance vivante dans le groupe SE (25%) en comparaison du groupe ST (29,2%) et SC (30,9%).

L'analyse morpho-cinétique (Annexe 3) a été réalisée sur un total de 365 embryons à 2 pronucléi dont 209 dans le groupe SC, 117 dans le groupe ST et 39 dans le groupe SE. Le délai entre la disparition des pronucléi et la première mitose était plus court chez les embryons du groupe ST comparativement aux embryons du groupe SC ($p < 0,05$). Les stades 6 et 9 cellules apparaissaient plus précocement chez les embryons du groupe ST et SC par rapport à ceux du groupe SE ($p < 0,05$). La synchronisation S2 (intervalle t4-t3) était plus longue pour les embryons du groupe SE par rapport au groupe SC et au groupe ST ($p < 0,05$). La compaction survenait plus tôt dans le groupe ST que dans le groupe SC ($p < 0,05$).

Les échecs de blastulation des embryons ayant atteints le stade morula étaient significativement plus nombreux dans le groupe SE (31,8%) par rapport aux groupes ST et SC (respectivement 6,2% et 11,6%, $p < 0,05$). Les anomalies de clivages étaient plus nombreuses pour les embryons issus de spermatozoïdes chirurgicaux (ST et SE) ; respectivement 17,0% et 12,8% ; versus 3,3% dans le groupe SC ($p < 0,05$). Une tendance semble se dessiner sur la proportion d'embryons vitrifiés en faveur du groupe testiculaire avec presque deux fois plus de blastocystes vitrifiés que dans le groupe épидидymaire (44,4% vs 28,2%, $p=0,07$) (Annexe 5).

Selon l'algorithme de Meseguer *et al*, il y avait au total, autant d'embryons respectant les clivages optimaux dans les 3 groupes (7,7% pour le groupe ST, 5,1% dans le groupe SE et 7,6% dans le groupe SC). Cependant, la proportion d'embryons respectant les timings de l'algorithme pour le deuxième cycle cellulaire (CC2) et la synchronisation (S2) était supérieure dans le groupe ST (respectivement 58,1% et 65,8%) par rapport au groupe SC (respectivement 45,9% et 53,6%, $p < 0,05$). Également, la proportion d'embryons respectant les timings de la synchronisation (S2) était inférieure dans le groupe MESA par rapport au groupe TESE (43,6% vs 65,8%, $p < 0,05$). La proportion d'embryons respectant les timings du

troisième cycle cellulaire (CC3) était plus grande dans le groupe SE par rapport au groupe ST (64,1% vs 44,4%, $p < 0,05$) (Annexe 6).

Une analyse morpho-cinétique spécifique sur 91 embryons transférés, dont les données de l'implantation étaient connues (2 transferts de 2 embryons ayant donné chacun 1 seule naissance vivante dans le groupe contrôle ont été exclus de l'analyse) mettait en évidence une association entre le taux de naissance vivante et une durée réduite de la synchronisation S2 ($p < 0,05$) (Annexe 4).

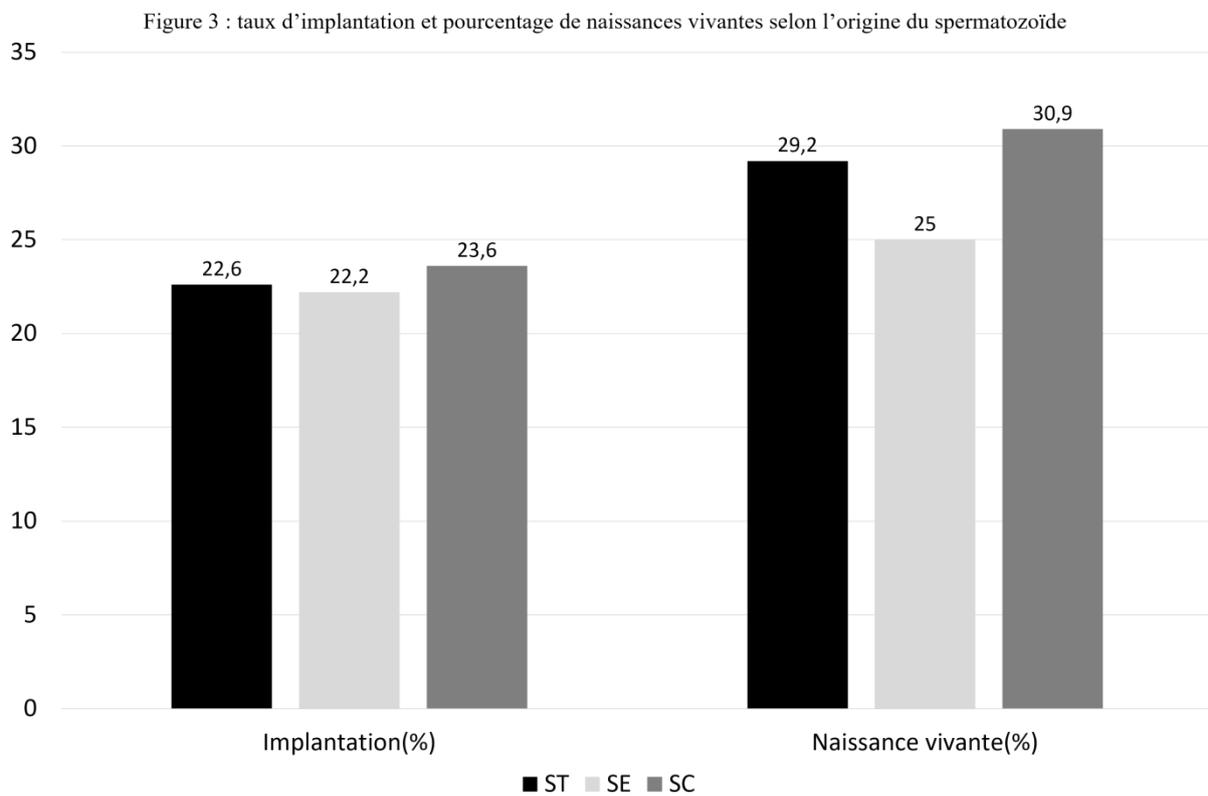


Figure 4 : taux de fécondation, échec de blastulation et pourcentage de blastocystes vitrifiés selon l'origine du spermatozoïde

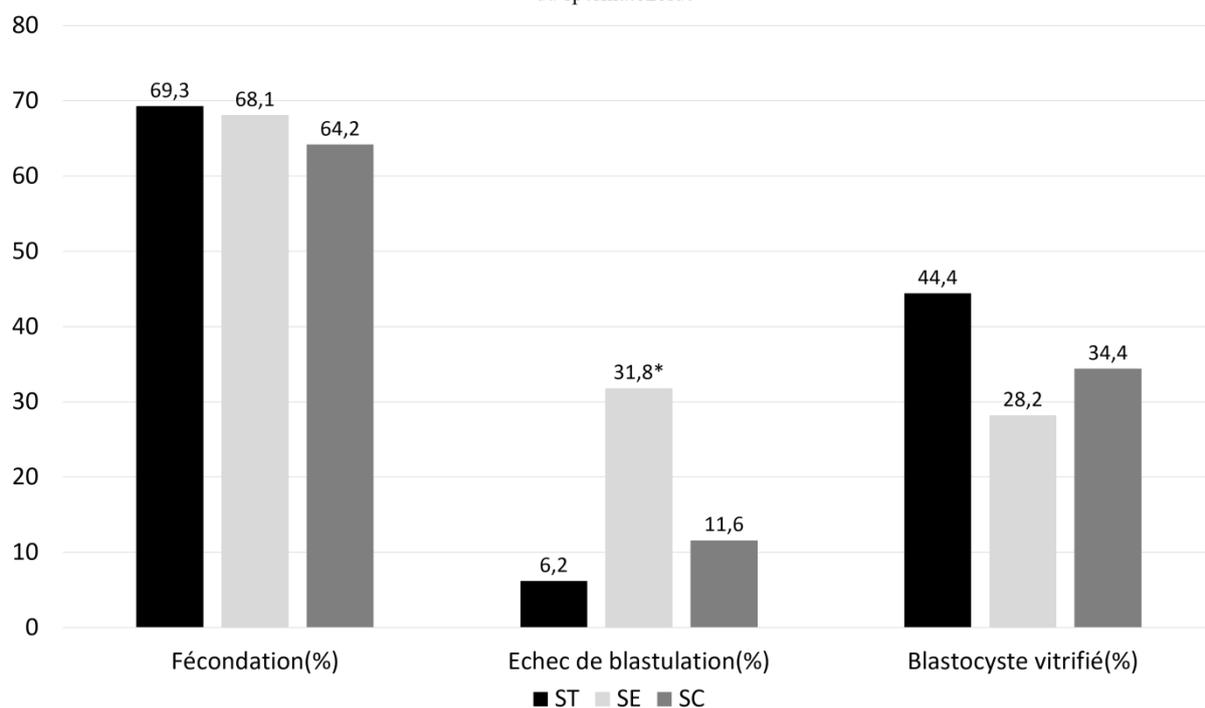
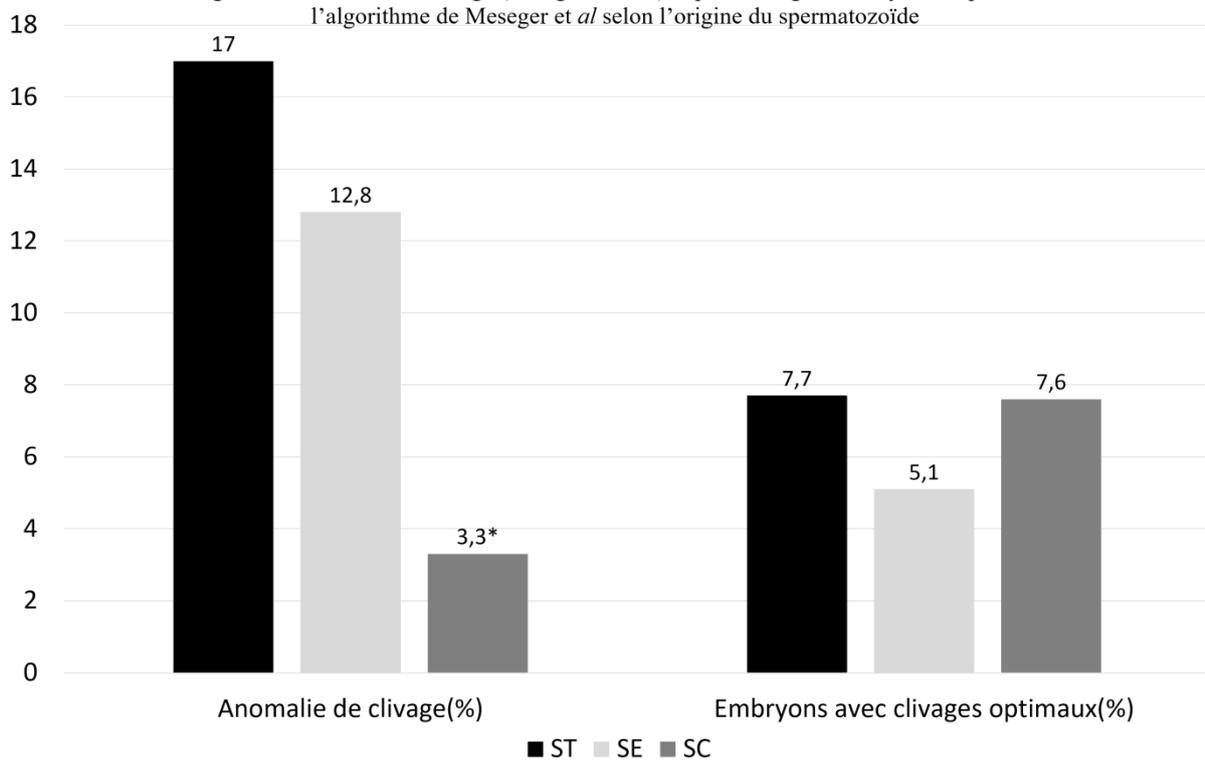


Figure 5 : anomalies de clivage (clivages directs) et pourcentage d'embryons respectant l'algorithme de Meseger et al selon l'origine du spermatozoïde



Discussion

La possibilité d'utiliser des spermatozoïdes chirurgicaux en ICSI a considérablement amélioré la prise en charge des couples dont les hommes présentent une azoospermie. L'origine du spermatozoïde micro-injecté sur le développement embryonnaire et sur la grossesse constitue un élément fondamental du pronostic lors du transfert embryonnaire. Plusieurs études ont été menées sans permettre de converger à une conclusion unanime. L'apport de l'évaluation morpho-cinétique médiée par le support technologique « time lapse » a permis de mieux caractériser l'influence paternelle sur le développement embryonnaire et d'identifier précisément les points les plus critiques du cycle cellulaire. A ces timings précis, il semblerait que les embryons issus des spermatozoïdes chirurgicaux présentent des comportements cinétiques différents de ceux des embryons issus de spermatozoïdes éjaculés. Dans cette étude, nous avons pour objectif d'évaluer les paramètres morpho-cinétiques et les issues cliniques des embryons de patients dont l'homme avait bénéficié d'une extraction chirurgicale de spermatozoïdes.

Un des premiers indicateurs morphologiques de l'activation du génome embryonnaire et de l'expression du génome paternel est l'initiation des jonctions serrées médiée par l'adhésion des E-cadherin vers le stade 8 cellules menant à la compaction(12,39). Les déficiences du génome nucléaire spermatique sont donc détectables à partir du 4^{ème} jour et communément décrites comme un « effet paternel tardif » à la différence des déficiences cytoplasmiques détectables dès la fécondation, pouvant être responsables d'un ralentissement et d'une altération de la qualité embryonnaire dès les premiers clivages ; décrit comme un « effet paternel précoce ». L'effet paternel précoce est souvent associé à des dysfonctions spermatiques en lien avec l'activation ovocytaire et l'apparition du centrosome tandis que l'effet paternel tardif est, quant à lui associé à une augmentation de l'incidence de la fragmentation de l'ADN(22,23).

Dans notre étude, comme dans celle de Buranet *al*, les embryons obtenus par TESE présentaient une cinétique de division plus rapide pour l'ensemble des cycles cellulaires. Le délai entre la disparition des pronucléi et la première mitose tout comme le temps de

synchronisation S2 étaient significativement plus courts par rapport au groupe contrôle. Cette cinétique pourrait être liée au degré d'imaturité nucléaire capable d'induire une accélération sur le développement embryonnaire précoce. En effet, durant la spermatogénèse, les histones, responsables de la décondensation de la chromatine, sont remplacées par des protamines et seulement 15 à 30% d'histones spécifiques persisteront dans les spermatozoïdes matures(23,40,41). Le transit épидидymaire favorise la condensation de l'ADN en stabilisant la structure de la chromatine à travers une déphosphorylation des protamines et une formation de ponts disulfure entre elles. Ainsi, le spermatozoïde testiculaire immature pourrait contenir plus d'histones et une chromatine moins condensée.

De manière intéressante, les embryons obtenus par TESE réalisaient leur compaction plus tôt que les embryons du groupe contrôle et cette différence n'apparaît significative que par rapport au groupe contrôle ; ce qui laisserait penser que la fragmentation de l'ADN ne peut être à elle seule responsable de cet effet cinétique tardif et qu'un autre mécanisme, éventuellement lié à l'imaturité nucléaire du spermatozoïde testiculaire, influence ce paramètre associé à l'expression du génome paternel.

Tout comme pour l'équipe de *Buran et al*, les embryons obtenus par MESA sont ceux présentant les cinétiques les plus longues sur l'ensemble des cycles cellulaires avec les temps S2, t6 et t9 significativement plus augmentés par rapport aux groupes contrôle et testiculaire. Ces résultats peuvent être liés à la forte prévalence des dommages de l'ADN des spermatozoïdes ayant un long séjour épидидymaire(42–44). Plusieurs études ont montré que l'ovocyte serait capable de réparer ces dommages et ce temps de réparation pourrait être responsable du ralentissement des divisions cellulaires(45). Il a également été rapporté que les embryons obtenus par MESA sont aussi porteurs d'anomalies génétiques complexes plus fréquentes en comparaison aux embryons issus de patients avec des paramètres spermatiques non altérés(46). Ces embryons montrent également des difficultés dans l'initiation de leurs blastulation, avec 5 fois plus d'embryons ne parvenant pas à passer cette étape par rapport au groupe testiculaire.

En accord avec les résultats de *Desai et al*, nous avons relevé des différences significatives sur les anomalies de clivages des embryons issus de spermatozoïdes chirurgicaux. L'incidence de ces anomalies était 4 à 6 fois plus élevée pour les embryons obtenus par MESA et TESE. Durant la fécondation le spermatozoïde contribue à l'organisation d'un centrosome zygotique fonctionnel en apportant deux centrioles après le

recrutement de protéines spécifiques du cytoplasme ovocytaire(19,20). Un héritage centrosomal inapte ou une dysfonction du centriole spermatique pourrait être la cause d'une spermatogénèse déficiente et, plus particulièrement chez les patients dont l'origine de l'azoospermie est sécrétoire. Également, le taux d'aneuploïdie spermatique plus élevé des spermatozoïdes testiculaires(47) des patients présentant une azoospermie non-obstructive pourrait être une hypothèse à la forte prévalence des anomalies de clivages embryonnaires des embryons obtenus par TESE.

Les résultats des issues cliniques après micro-injection de spermatozoïdes chirurgicaux varient en fonction des études(48). L'étiologie de l'azoospermie semblerait y contribuer même si certains auteurs ont observés des taux de naissance vivante significativement inférieurs avec le sperme testiculaire de patients au profil obstructif, c'est-à-dire avec *a priori* une spermatogénèse conservée(49). Nos résultats en termes d'issues cliniques sur les embryons frais transférés ne montraient aucune différence significative entre les trois groupes comme observé chez Desai *et al.* Cependant, l'analyse en sous-groupes des blastocystes vitrifiés montrait près de 2 fois plus de conservation embryonnaire dans le groupe testiculaire que dans le groupe épидидymaire. Cette tendance suggère qu'avec des effectifs plus conséquents, notamment dans le groupe épидидymaire, cette différence pourrait s'avérer significative et une analyse des issues cliniques cumulées pourrait révéler des différences entre ces 2 groupes.

Notre objectif était comparable à celui de Buranet *al* (60 patients), Desai *et al* (93 cycles), et Scarselliet *al* (66 cycles) mais une divergence méthodologique importante se situait sur la composition du groupe contrôle expliquant certaines discordances avec nos résultats, notamment sur les taux de fécondation et la proportion de blastocystes significativement en faveur du groupe contrôle dans ces études. En effet, ces trois études ont composés un groupe contrôle à partir d'éjaculats de patients dont les paramètres spermatiques étaient non altérés alors que notre groupe contrôle se constituait principalement d'éjaculats présentant une oligo-asthéo-tératozoospermie issues d'une spermatogénèse potentiellement altérée pouvant influencer les résultats biologiques observés pour les couples dont les embryons étaient issus de spermatozoïdes testiculaires dans notre étude. En effet, à la différence des études citées ci-dessus, notre groupe contrôle présentait un taux de fécondation et une proportion de blastocystes vitrifiés inférieure au groupe testiculaire mais cette différence était non significative.

Ces résultats, nous permettent de nous interroger sur l'utilisation de spermatozoïdes testiculaires chez les patients OAT présentant des anomalies du développement morpho-cinétique embryonnaire associés à des échecs d'implantation répétés. Chez ces couples dont les hommes présentent un ADN spermatique fragmenté certaines études révèlent de meilleurs taux de grossesses et moins de fausse couche avec l'utilisation de spermatozoïdes testiculaires(50–52)

L'analyse spécifique des embryons transférés montrait que les embryons ayant donné des naissances vivantes sont ceux dont la synchronisation était réduite. Ce paramètre morpho cinétique apparaît être aujourd'hui un indicateur cinétique majeur, précoce et fiable de la qualité embryonnaire et qui est repris dans la plupart des derniers algorithmes préimplantatoires de la littérature(29,37,38). Ainsi, un embryon avec une cinétique optimale doit réaliser sa synchronisation en moins d'1heure.

Nous nous sommes interrogés sur la proportion d'embryons issus de spermatozoïdes chirurgicaux présentant des profils de clivages optimaux en nous référant aux critères de l'algorithme de Mesegeret *al*. Cela semblait être plus relevant dans la manière d'identifier des différences dans les cohortes d'embryons aux origines diverses et peut être plus significatif que de comparer des moyennes cinétiques. Nous avons sélectionné des timings cinétiques associés au développement embryonnaire et à l'implantation(37,38). A l'inverse de Desai *et al*, une proportion significativement plus élevée d'embryons du groupe testiculaire complétait le second cycle cellulaire avec l'intervalle de temps optimal en comparaison du groupe contrôle. De même, pour la synchronisation S2, les embryons issus de spermatozoïdes testiculaires étaient significativement plus nombreux à terminer la synchronisation S2 dans l'intervalle de temps considéré comme optimal. Cependant, au total, il y avait autant d'embryons respectant la totalité des critères de l'algorithme dans les trois groupes.

Les deux principales limites de cette étude sont sa nature rétrospective et son manque de puissance, plus particulièrement pour le groupe épididymaire. La composition du groupe contrôle est cruciale et à prendre en compte dans l'analyse. Il est aussi important de noter que les spermatozoïdes chirurgicaux étaient utilisés après décongélation, contrairement au groupe contrôle éjaculé. De plus, la faible proportion d'embryons transférés à J5 nous a limité dans l'analyse morpho-cinétique tardive des embryons ayant donné une naissance. Il sera donc intéressant de poursuivre cette étude en analysant les transferts d'embryons congelés et les

issues cliniques cumulées et de l'étayer par l'analyse des transferts embryonnaires au stade blastocyste qui se sont généralisés depuis plusieurs années dans le centre où l'étude a été réalisée.

Conclusion

En conclusion, cette étude révèle un effet paternel morpho-cinétique présent sur l'ensemble du développement embryonnaire préimplantatoire. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les différences observées sur les clivages (t2-Pnf, S2, t6, t9, SC) correspondent à un effet paternel précoce et tardif, que le spermatozoïde immature est capable d'être associé à un développement précoce plus rapide en lien avec son degré de maturation nucléaire. Un haut degré de fragmentation de l'ADN peut être associé à un retard dans les divisions cellulaires et ainsi compromettre un développement embryonnaire à la cinétique optimale

Au vu des résultats obtenus dans le groupe épидидymaire, l'utilisation du spermatozoïde testiculaire semblerait préférable à celle du spermatozoïde épидидymaire lors de la micro-injection.

Les facteurs morpho-cinétiques les plus pertinents restent à identifier afin de guider au mieux le choix biologique de l'embryon à transférer mais la synchronisation S2 pourrait être un paramètre important à prendre en compte, notamment pour les transferts d'embryon J2-J3 présentant peu de recul morpho-cinétique.

Le manque de puissance est une des principales limites de cette étude et l'ensemble de nos résultats doivent être confirmés sur de plus larges effectifs.

BIBLIOGRAPHIE

1. Vogt PH. Genetics of idiopathic male infertility: Y chromosomal azoospermia factors (AZFa, AZFb, AZFc). *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* déc 1997;11(4):773-95.
2. Vicdan A, Vicdan K, Günalp S, Kence A, Akarsu C, Işık AZ, et al. Genetic aspects of human male infertility: the frequency of chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in severe male factor infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 10 nov 2004;117(1):49-54.
3. Schlegel PN. Male infertility: evaluation and sperm retrieval. *Clin Obstet Gynecol.* mars 2006;49(1):55-72.
4. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Goossens A, Tournaye H, Camus M, et al. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod Oxf Engl.* juin 1995;10(6):1457-60.
5. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *Int Braz J Urol Off J Braz Soc Urol.* oct 2011;37(5):570-83.
6. Schwarzer JU, Fiedler K, v Hertwig I, Krüsmann G, Würfel W, Schleyer M, et al. Sperm retrieval procedures and intracytoplasmic spermatozoa injection with epididymal and testicular sperms. *Urol Int.* 2003;70(2):119-23.
7. Friedler S, Raziel A, Soffer Y, Strassburger D, Komarovsky D, Ron-el R. Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia--a comparative study. *Fertil Steril.* nov 1997;68(5):892-7.
8. Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Fahmi I, Ramzy AM, Amin Y. Intracytoplasmic sperm injection using microsurgically retrieved epididymal and testicular sperm. *Fertil Steril.* mars 1996;65(3):566-72.
9. Corona G, Minhas S, Giwercman A, Bettocchi C, Dinkelman-Smit M, Dohle G, et al. Sperm recovery and ICSI outcomes in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 5 nov 2019;25(6):733-57.
10. Boitrelle F, Robin G, Marcelli F, Albert M, Leroy-Martin B, Dewailly D, et al. A predictive score for testicular sperm extraction quality and surgical ICSI outcome in non-obstructive azoospermia: a retrospective study. *Hum Reprod Oxf Engl.* déc 2011;26(12):3215-21.
11. Park Y-S, Kim MK, Lim CK, Lee S-H, Park D-W, Seo JT, et al. Efficacy of cryopreservation of embryos generated by intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa from frozen testicular tissue. *J Assist Reprod Genet.* oct 2014;31(10):1331-6.
12. Tesarik J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod Biomed Online.* mars 2005;10(3):370-5.

13. De Croo I, Van der Elst J, Everaert K, De Sutter P, Dhont M. Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod Oxf Engl.* juin 2000;15(6):1383-8.
14. Mercan R, Urman B, Alatas C, Aksoy S, Nuhoglu A, Isiklar A, et al. Outcome of testicular sperm retrieval procedures in non-obstructive azoospermia: percutaneous aspiration versus open biopsy. *Hum Reprod Oxf Engl.* juill 2000;15(7):1548-51.
15. Palermo GD, Schlegel PN, Hariprashad JJ, Ergün B, Mielnik A, Zaninovic N, et al. Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum Reprod Oxf Engl.* mars 1999;14(3):741-8.
16. Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Mercan R, Aksoy S, et al. Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated, epididymal or testicular spermatozoa. *Hum Reprod Oxf Engl.* janv 2001;16(1):125-9.
17. Pasqualotto FF, Rossi-Ferragut LM, Rocha CC, Iaconelli A, Borges E. Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm obtained from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *J Urol.* avr 2002;167(4):1753-6.
18. Rossi-Ferragut LM, Iaconelli A, Aoki T, Rocha CC, dos Santos DR, Pasqualotto FF, et al. Pronuclear and morphological features as a cumulative score to select embryos in ICSI (intracytoplasmic sperm injection) cycles according to sperm origin. *J Assist Reprod Genet.* janv 2003;20(1):1-7.
19. Terada Y, Schatten G, Hasegawa H, Yaegashi N. Essential roles of the sperm centrosome in human fertilization: developing the therapy for fertilization failure due to sperm centrosomal dysfunction. *Tohoku J Exp Med.* avr 2010;220(4):247-58.
20. Schatten H, Sun Q-Y. New insights into the role of centrosomes in mammalian fertilization and implications for ART. *Reprod Camb Engl.* déc 2011;142(6):793-801.
21. Amdani SN, Yeste M, Jones C, Coward K. Sperm Factors and Oocyte Activation: Current Controversies and Considerations. *Biol Reprod.* août 2015;93(2):50.
22. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod Oxf Engl.* mars 2004;19(3):611-5.
23. Barroso G, Valdespin C, Vega E, Kershenovich R, Avila R, Avendaño C, et al. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil Steril.* sept 2009;92(3):835-48.
24. Antczak M, Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod Oxf Engl.* févr 1999;14(2):429-47.
25. Castillo CM, Harper J, Roberts SA, O'Neill HC, Johnstone ED, Brison DR. The impact of selected embryo culture conditions on ART treatment cycle outcomes: a UK national study. *Hum Reprod Open.* 2020;2020(1):hoz031.

26. Morbeck DE, Baumann NA, Oglesbee D. Composition of single-step media used for human embryo culture. *Fertil Steril.* avr 2017;107(4):1055-1060.e1.
27. Hardarson T, Bungum M, Conaghan J, Meintjes M, Chantilis SJ, Molnar L, et al. Noninferiority, randomized, controlled trial comparing embryo development using media developed for sequential or undisturbed culture in a time-lapse setup. *Fertil Steril.* déc 2015;104(6):1452-1459.e1-4.
28. Cruz M, Gadea B, Garrido N, Pedersen KS, Martínez M, Pérez-Cano I, et al. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet.* juill 2011;28(7):569-73.
29. Herrero J, Meseguer M. Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. *Fertil Steril.* 15 mars 2013;99(4):1030-4.
30. Athayde Wirka K, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B, et al. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. *Fertil Steril.* juin 2014;101(6):1637-1648.e1-5.
31. Kirkegaard K, Ahlström A, Ingerslev HJ, Hardarson T. Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertil Steril.* févr 2015;103(2):323-32.
32. Buran A, Tulay P, Dayioğlu N, Bakircioglu ME, Bahceci M, İrez T. Evaluation of the morphokinetic parameters and development of pre-implantation embryos obtained by testicular, epididymal and ejaculate spermatozoa using time-lapse imaging system. *Andrologia.* mai 2019;51(4):e13217.
33. Scarselli F, Casciani V, Cursio E, Muzzi S, Colasante A, Gatti S, et al. Influence of human sperm origin, testicular or ejaculated, on embryo morphokinetic development. *Andrologia.* oct 2018;50(8):e13061.
34. Desai N, Gill P, Tadros NN, Goldberg JM, Sabanegh E, Falcone T. Azoospermia and embryo morphokinetics: testicular sperm-derived embryos exhibit delays in early cell cycle events and increased arrest prior to compaction. *J Assist Reprod Genet.* juill 2018;35(7):1339-48.
35. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod Oxf Engl.* juin 2011;26(6):1270-83.
36. Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, Aguilar J, Chamayou S, Esbert M, et al. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum Reprod Oxf Engl.* déc 2014;29(12):2650-60.
37. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod Oxf Engl.* oct 2011;26(10):2658-71.
38. Basile N, Vime P, Florensa M, Aparicio Ruiz B, García Velasco JA, Remohí J, et al. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and

- validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod Oxf Engl.* févr 2015;30(2):276-83.
39. Fleming TP, Sheth B, Fesenko I. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. *Front Biosci J Virtual Libr.* 1 août 2001;6:D1000-1007.
 40. Zini A, Gabriel MS, Zhang X. The histone to protamine ratio in human spermatozoa: comparative study of whole and processed semen. *Fertil Steril.* janv 2007;87(1):217-9.
 41. Zini A, Zhang X, San Gabriel M. Sperm nuclear histone H2B: correlation with sperm DNA denaturation and DNA stainability. *Asian J Androl.* nov 2008;10(6):865-71.
 42. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Gil-Salom M, Remohí J, Fernandez JL. Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril.* nov 2009;92(5):1638-45.
 43. Simon L, Emery BR, Carrell DT. Review: Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* oct 2017;44:38-56.
 44. Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod Oxf Engl.* nov 2014;29(11):2402-12.
 45. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool.* 1 nov 1999;284(6):696-704.
 46. Weng S-PF, Surrey MW, Danzer HC, Hill DL, Chen P-C, Wu T-CJ. Chromosome abnormalities in embryos derived from microsurgical epididymal sperm aspiration and testicular sperm extraction. *Taiwan J Obstet Gynecol.* juin 2014;53(2):202-5.
 47. Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, et al. Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum Reprod Oxf Engl.* août 2005;20(8):2140-52.
 48. Nicopoullou JDM, Gilling-Smith C, Almeida PA, Norman-Taylor J, Grace I, Ramsay JWA. Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis. *Fertil Steril.* sept 2004;82(3):691-701.
 49. van Wely M, Barbey N, Meissner A, Repping S, Silber SJ. Live birth rates after MESA or TESE in men with obstructive azoospermia: is there a difference? *Hum Reprod Oxf Engl.* avr 2015;30(4):761-6.
 50. Esteves SC, Roque M, Bradley CK, Garrido N. Reproductive outcomes of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with high levels of DNA fragmentation in semen: systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2017;108(3):456-467.e1.
 51. Awaga HA, Bosdou JK, Goulis DG, Chatzimeletiou K, Salem M, Roshdy S, et al. Testicular versus ejaculated spermatozoa for ICSI in patients without azoospermia: A systematic review. *Reprod Biomed Online.* nov 2018;37(5):573-80.

52. Zini A, Bach PV, Al-Malki AH, Schlegel PN. Use of testicular sperm for ICSI in oligozoospermic couples: how far should we go? *Hum Reprod Oxf Engl.* 2017;32(1):7-13.

Annexe 1 : Définition des annotations morpho-cinétiques de l'analyse en time lapse.

Temps	Définition des annotations
t_0	Micro-injection
t_{PNa}	Apparition des pronucléi
t_{PNf}	Disparition des pronucléi
t_2 à t_9	Temps de 2 à 9 cellules (première image de l'individualisation des cellules)
t_{SC}	Début de compaction
t_M	Compaction total (dernière image avant la cavitation)
t_{SB}	Début de blastulation (première image de l'initiation de la cavitation)
t_B	Dernière image avant amincissement de la zone pellucide
t_{EB}	Première image de l'amincissement de la zone pellucide
$t_{PNf}-t_{PNa}$	Durée d'apparition des pronucléi
t_3-t_2	Durée du second cycle cellulaire
t_5-t_3	Durée du troisième cycle cellulaire
t_4-t_3	Synchronisation de la division cellulaire
t_B-t_{SB}	Durée de la blastulation

Annexe 2 : Détails clinico-biologiques des couples dans les groupes testiculaire (ST),
épididymaire (SE) et contrôle (SC).

<i>n = couples/cycles</i>	Groupe SC (n=41/48)	Groupe ST (n=23/27)	Groupe SE (n=6/8)	p value
<i>Age maternel</i>	32,7	31,0	34,8	0,3
<i>Ovocytes récupérés/patient</i>	11,2	12,1	12,3	0,8
<i>Meta II/patient</i>	8,3	8,9	10,4	0,7
<i>Taux de fécondation (%)</i>	64,2%	69,3%	68,1%	0,8
<i>Embryons transférés (nombre)</i>	55	31	9	
<i>Embryons transférés (moyenne)</i>	1,1	1,1	1,1	0,9
<i>Transfert J2-J3</i>	35	23	6	
<i>Transfert J5</i>	7	1	2	
<i>Taux d'implantation (%) (par embryon)</i>	23,6% (13/55)	22,6% (7/31)	22,2% (2/9)	0,93
<i>Naissances vivantes (%) (par transfert)</i>	30,9% (13/42)	29,2% (7/24)	25,0% (2/8)	0,80

Annexe 3 : Résultats de l'analyse de donnée morpho-cinétique des embryons issus de spermatozoïdes testiculaires (ST), épидидymaires (SE) et éjaculés (SC).

<i>n = embryons 2PN</i>	Groupe ST (n=117)	Groupe SE (n=39)	Groupe SC (n=209)	Mann-Whitney p value
<i>Pna (h)</i>	6,28	7,01	7,17	0,87
<i>Pnf (h)</i>	22,06	23,49	23,34	0,12
<i>t2 (h)</i>	24,83	26,60	26,27	0,13
<i>t3 (h)</i>	33,84	34,88	35,37	0,52
<i>t4 (h)</i>	36,40	39,56	38,02	0,20
<i>t5 (h)</i>	43,74	48,01	48,21	0,30
<i>t6 (h)</i>	49,56	54,00	53,32	0,03 ^a
<i>t7 (h)</i>	53,60	57,59	58,82	0,34
<i>t8 (h)</i>	57,84	65,52	63,58	0,12
<i>t9+ (h)</i>	64,41	71,63	71,13	0,02 ^a
<i>SC (h)</i>	77,52	82,97	82,06	0,03 ^b
<i>tM (h)</i>	90,88	98,30	96,04	0,36
<i>tSB (h)</i>	95,25	101,15	97,89	0,15
<i>tB (h)</i>	105,84	111,81	108,78	0,24
<i>tEB (h)</i>	105,78	113,43	109,75	0,32
<i>t3-t2 (cc2) (h)</i>	9,01	8,48	9,23	0,92
<i>t4-t3 (S2) (h)</i>	2,63	4,98	3,16	0,02 ^c
<i>t5-t3 (cc3) (h)</i>	10,99	13,91	13,61	0,52
<i>t4-t2 (h)</i>	11,93	14,05	12,29	0,59
<i>PNf-Pna (h)</i>	15,60	15,80	16,10	0,27
<i>tM-PNf (h)</i>	66,62	75,66	73,79	0,47
<i>tB-tM (h)</i>	15,80	15,04	13,73	0,69
<i>t2-Pna (h)</i>	18,44	19,00	19,06	0,41
<i>t2-Pnf (h)</i>	2,78	3,13	2,87	0,01 ^b
<i>t5-t4 (h)</i>	8,23	9,13	10,24	0,93
<i>t6-t5 (h)</i>	4,94	5,55	5,23	0,61
<i>t7-t6 (h)</i>	3,67	3,84	5,91	0,61
<i>tSB-Pnf (h)</i>	73,26	78,01	75,58	0,38
<i>tB-Pnf (h)</i>	83,81	88,69	86,55	0,27
<i>tEB-Pnf (h)</i>	83,30	90,31	87,52	0,58
<i>tSB-Pna (h)</i>	89,08	94,71	90,13	0,80
<i>tB-Pna (h)</i>	99,15	105,37	101,94	0,66
<i>tEB-Pna (h)</i>	99,04	106,99	102,91	0,64

ST versus SC et SE^c

ST versus SC^b

ST et SC versus SE^a

Annexe 4 : Résultats de l'analyse de donnée morpho-cinétique des embryons transférés.

<i>n = embryons 2PN</i>	Naissance Vivante (n=19)	Pas de grossesse (n=72)	Mann-Whitney p value
<i>Pna (h)</i>	6,62	6,68	0,95
<i>Pnf (h)</i>	22,46	22,58	0,88
<i>t2 (h)</i>	24,93	24,97	0,21
<i>t3 (h)</i>	34,74	35,40	0,46
<i>t4 (h)</i>	36,58	37,92	0,56
<i>t5 (h)</i>	43,69	47,49	0,24
<i>t6 (h)</i>	47,73	51,45	0,83
<i>t7 (h)</i>	51,64	54,24	0,73
<i>t8 (h)</i>	55,29	58,57	0,69
<i>t9+ (h)</i>	65,54	67,32	0,48
<i>SC (h)</i>	76,14	75,99	0,39
<i>tM (h)</i>	96,26	94,03	0,53
<i>tSB (h)</i>	97,88	95,40	0,64
<i>tB (h)</i>	105,91	105,25	0,70
<i>tEB (h)</i>	106,85	105,92	0,96
<i>t3-t2 (cc2) (h)</i>	9,81	10,42	0,53
<i>t4-t3 (S2) (h)</i>	1,85	2,52	0,02
<i>t5-t3 (cc3) (h)</i>	12,08	12,76	0,40
<i>t4-t2 (h)</i>	11,66	12,94	0,30
<i>PNf-Pna (h)</i>	15,84	15,89	0,08
<i>tM-PNf (h)</i>	73,93	72,49	0,90
<i>tB-tM (h)</i>	9,66	11,22	0,39
<i>t2-Pna (h)</i>	18,31	18,29	0,48
<i>t2-Pnf (h)</i>	2,47	2,40	0,28
<i>t5-t4 (h)</i>	8,19	8,24	0,25
<i>t6-t5 (h)</i>	3,96	4,08	0,47
<i>t7-t6 (h)</i>	3,90	2,79	0,93
<i>tSB-Pnf (h)</i>	75,55	73,86	0,70
<i>tB-Pnf (h)</i>	83,58	83,72	0,12
<i>tEB-Pnf (h)</i>	84,52	84,38	0,87
<i>tSB-Pna (h)</i>	90,49	88,74	0,64
<i>tB-Pna (h)</i>	98,52	98,60	0,87
<i>tEB-Pna (h)</i>	99,46	99,26	0,39

Annexe 5 : Comparaison du comportement des blastocystes dans les groupes testiculaire (ST),
épididymaire (SE) et contrôle (SC).

<i>n = embryons 2PN</i>	Groupe ST (n=117)	Groupe SE (n=39)	Groupe SC (n= 209)	X² p value
<i>Blastocystes (nombre)</i>	44	15	90	
<i>Blastocystes (%)</i>	37,6% (44/117)	38,4% (15/39)	43% (90/209)	0,60
<i>Expansion (%)</i>	35,0% (41/117)	38,4% (15/39)	43% (90/209)	0,47
<i>Echec de blastulation (%)</i>	6,2% (3/48)	31,8% (7/22)	11,6% (12/103)	0,01 ^a
<i>Anomalies de clivages (%)</i>	17,0% (20/117)	12,8% (5/39)	3,3% (7/209)	0,01 ^b
<i>blastocystes vitrifiés</i>	44,4% (52/117)	28,2% (11/39)	34,4% (72/209)	0,07

SC versus ST et SE^bST et SC versus SE^a

Annexe 6 : Proportion d'embryons respectant les intervalles de temps optimaux dans les groupes testiculaire (ST), épидидymaire (SE) et contrôle (SC).

<i>n = embryons 2PN</i>	Groupe ST (n=117)	Groupe SE (n=39)	Groupe SC (n=209)	X² p value
<i>5h < t3-t2 < 12h</i>	58,1% (68/117)	48,7% (19/39)	45,9% (96/209)	0,03 ^a
<i>t4-t3 < 1h</i>	65,8% (77/117)	43,6% (17/39)	53,6% (112/209)	0,02 ^b
<i>45h < t5 < 57h</i>	24,8% (29/117)	38,6% (15/39)	33,5% (70/209)	0,24
<i>9,7h < t5-t3 < 21h</i>	44,4% (52/117)	64,1% (25/39)	51,7% (108/209)	0,03 ^c
<i>tSB < 96,2h</i>	23,9% (28/117)	15,4% (6/39)	21,5% (45/209)	0,41
<i>tEB < 116h</i>	25,6% (30/117)	23,0% (9/39)	33,5% (70/209)	0,35
<i>total</i>	7,7% (9/117)	5,1% (2/39)	7,6% (16/209)	0,71

ST versus SC^a ST versus SC et SE^b SE versus ST^c

Morpho-cinétique embryonnaire préimplantatoire et issues cliniques après micro-injection de spermatozoïdes chirurgicaux

Introduction : Le spermatozoïde joue un rôle essentiel dans l'activation du génome embryonnaire et dans le développement de l'embryon. L'objectif de cette étude est de déterminer s'il existe une association entre l'origine du spermatozoïde et les paramètres morpho-cinétiques, les anomalies de clivage embryonnaires préimplantatoires et les issues cliniques du transfert de ces embryons.

Matériels et méthodes : Nous avons mené une étude rétrospective du 1^{er} janvier 2016 au 31 octobre 2019 à l'hôpital Bichat. Ainsi, ont été inclus les couples dont les femmes avaient moins de 38 ans et ne présentaient pas de facteur identifié d'infertilité ; excepté une indication tubaire stricte. De plus, ont été exclus les hommes présentant une infertilité d'origine génétique (anomalies caryotypiques et micro-délétions AZF).

Trois groupes ont été constitués selon l'origine du spermatozoïde utilisé lors de la micro-injection : spermatozoïde testiculaire (ST), spermatozoïde épидидymaire (SE) et un groupe contrôle spermatozoïde éjaculé (SC) (concentration spermatique supérieure à 5 M/ml).

Résultats : A partir de 83 cycles d'ICSI (70 couples), 209 embryons à deux pronuclei pour le groupe SC ont été observés ainsi que 117 embryons pour le groupe ST et 39 embryons pour le groupe SC.

Concernant les paramètres morpho-cinétiques, le délai entre la disparition des pronuclei et la première mitose était plus court chez les embryons du groupe ST comparativement aux embryons du groupe SC ($p < 0,05$). Le stade 6 et 9 cellules apparaissait plus précocement chez les embryons du groupe ST et SC par rapport à ceux du groupe SE ($p < 0,05$). La synchronisation S2 (intervalle t4-t3) était plus longue pour les embryons du groupe SE par rapport au groupe SC et au groupe ST ($p < 0,05$). Les anomalies de clivages étaient plus nombreuses dans les embryons issus de spermatozoïdes chirurgicaux (ST et SE) ; respectivement 17,0% et 12,8% ; versus 3,3% dans le groupe SC ($p < 0,05$). La compaction survenait plus tôt dans le groupe ST que dans le groupe SC ($p < 0,05$). Les échecs de blastulation des embryons ayant atteint le stade morula étaient significativement plus nombreux dans le groupe SE (31,8%) par rapport aux groupes ST et SC (respectivement 6,2% et 11,6%).

Une analyse spécifique des embryons transférés mettait en évidence une association entre le taux de naissance vivante et une durée réduite de la synchronisation S2.

Conclusion : L'analyse morphocinétique de l'embryon a permis de révéler une association entre l'origine du spermatozoïde et son développement préimplantatoire. Ainsi, l'utilisation du spermatozoïde testiculaire semblerait préférable à celle du spermatozoïde épидидymaire.

Mots clés : Morpho-cinétique embryonnaire, TESE, MESA, Biopsie testiculaire, Issues cliniques

Université Paris Descartes
Faculté de Médecine Paris Descartes
15, rue de l'Ecole de Médecine
75270 Paris cedex 06