



HAL
open science

[Pre-implantation genetic testing: Comparison between cleavage stage and blastocyst biopsy].

J. Bacus, J. Lammers, S. Loubersac, T. Lefebvre, F. Leperlier, P. Barriere, T. Fréour, A. Reignier

► To cite this version:

J. Bacus, J. Lammers, S. Loubersac, T. Lefebvre, F. Leperlier, et al.. [Pre-implantation genetic testing: Comparison between cleavage stage and blastocyst biopsy].. *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie*, 2021, 49 (4), pp.266-274. 10.1016/j.gofs.2020.11.019 . hal-04706613

HAL Id: hal-04706613

<https://hal.science/hal-04706613v1>

Submitted on 13 Nov 2024

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 4.0 International License

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 Bacus¹, Jenna Lammers^{1,2}, Sophie Loubersac^{1,2}, Tiphaine Lefebvre¹, Florence Leperlier¹, Paul Barriere^{1,2}, Thomas Fréour^{1,2}, Arnaud Reignier^{1,2}

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 Transplantatino Urologie Néphrologie, F-44000 Nantes, France.

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 au 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 d'ovocytes et donc d'embryons à biopsier [12], la mutation à l'origine de la maladie doit avoir été préalablement identifiée et la technique d'identification de l'anomalie génétique sur l'embryon doit être réalisable. Deux grandes 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

récioproques 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^{ème} jour de développement, ou plus tardivement au stade blastocyste grâce au prélèvement d'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 à de nombreuses contraintes organisationnelles. Elle nécessite de s'adapter à la cinétique de développement du blastocyste et requiert la congélation quasi systématique des blastocystes [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^{ème} jour de développement embryonnaire (J3) et la biopsie de trophoctoderme au 5^{ème} 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 (cycles avec congélation totale et blastocystes surnuméraires des cycles avec transfert frais) 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, 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 (SynVitto® 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 et sous atmosphère réduite en oxygène (5% d'O₂, 6% CO₂) 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^{ème} 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 dans l'attente du résultat 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 niveau 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 ainsi 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 sacs gestationnels sur le 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). 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 (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'indice de masse corporelle (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.

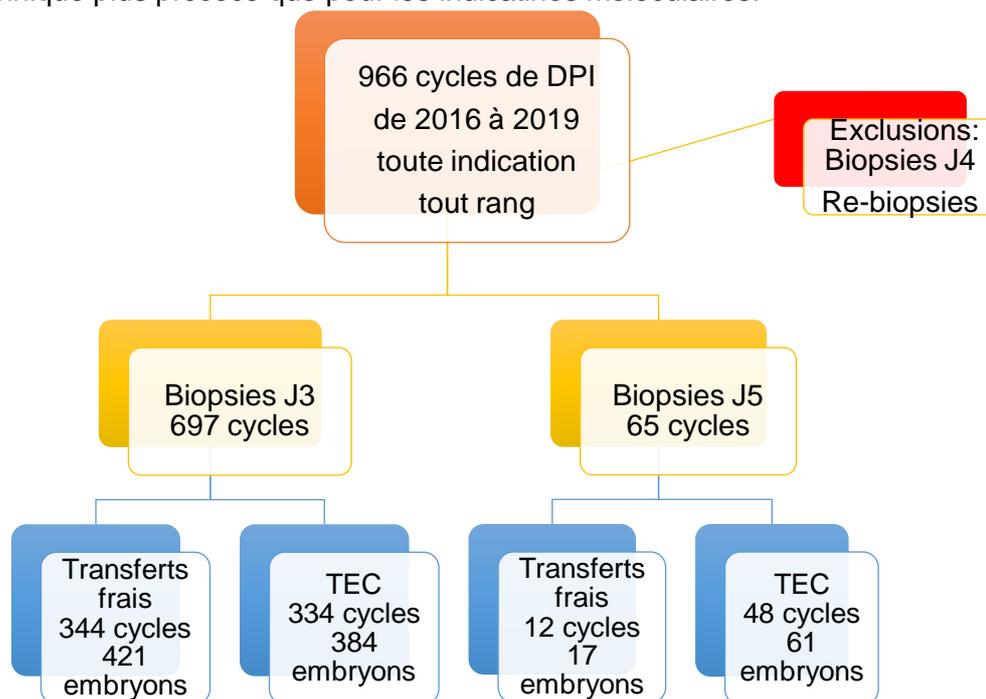


Figure 2 : Schéma d'inclusion.

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

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 similaires dans nos deux groupes ($2295,7 \pm 860,3$ unités de FSH dans le groupe des biopsies J3 pour $2107,3 \pm 802,5$ 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 dans les deux groupes, les taux d'embryons utiles et les taux d'embryons biopsiés inutilement. 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. En revanche, 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
Nombre total d'embryons biopsiés	n = 3218	n = 276	
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
Nombre total de cycles de freeze all (n)	158 (22.7%)	38 (58.5%)	p= 6.10⁻⁹*

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 de grossesse multiple (*tableau 3*).

	Biopsie J3	Biopsie J5	Significativité
Nombre total de cycles avec transfert frais (n)	344	12	
Indication du DPI			p= 2,4.10⁻⁶*
DPI moléculaire (%)	63.6	0	
DPI cytogénétique (%)	36.4	100	
Nombre d'embryon par transfert	1,2 ± 0,4 (n= 421]	1,4 ± 0,5 (n= 17]	p= 0,2249
Nombre de SET (n)	267	7	p= 0,1568
Nombre de DET (n)	77	5	
Taux d'implantation (%)	21,85 (n= 92]	11,77 (n=2]	p= 0,5454
Taux de grossesse débutante (%)	29,65 (n= 102]	16,66 (n=2]	p= 0,7375
Taux de grossesse clinique (%)	23,26 (n= 80]	16,66 (n=2]	p= 0,7406
Taux de naissance vivante (%)	25,58 (n= 88]	16,66 (n=2]	p= 0,7375
Taux de grossesse multiple (%)	8,82 (n= 9]	0	p= 1
Taux de fausse couche spontanée (%)	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	p= 3,5.10-7*
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)	p= 0,0006*
Taux de grossesse débutante (%)	18,86 (n= 63)	37,5 (n= 18)	p= 0,0344*
Taux de grossesse clinique (%)	9,28 (n= 31)	27,1 (n= 13)	p= 0,0052*
Taux de naissance vivante (%)	8,98 (n= 30)	35,42 (n= 17)	p= 0,0001*
Taux de grossesse multiple (%)	0	2,22 (n= 4)	p= 0,0018*
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, ce qui pourrait expliquer nos taux de réussite clinique faibles après transfert congelé d'embryons biopsiés à J3, en plus de la petite taille de notre échantillon de biopsies J5. Les résultats des transferts d'embryons congelés hors DPI pour la même période (n=2942) étant les suivants : taux de grossesse clinique par transfert de 27.8% et taux de naissance vivante par transfert de 21%. Ces résultats sont donc rassurants sur la performance de notre programme de vitrification embryonnaire.

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 très faible vis-à-vis des 67% de biopsies

de trophoctoderme rapportées par l'ESHRE en Europe en 2017. La biopsie est généralement réalisée au moment le plus opportun du stade blastocyste (B5), 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 avec *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. Cette différence peut s'expliquer par des critères d'éligibilité à la biopsie qui sont très sélectifs à J3 : absence d'anomalie de clivage visualisable en time-lapse, présence d'au minimum 6 blastomères. En revanche, plus de cycles sans transferts ou congélation pour causes d'absence d'embryon sain et/ou de morphologie embryonnaire étaient rencontrés dans le groupe J3 par rapport au groupe J5 (56,39% contre 23,07%, $p= 7.10^{-7}$). Le taux

d'annulation de biopsie pour cause d'absence d'embryon de qualité morphologique et/ou morpho-cinétique suffisante était quant à lui comparable entre les groupes : 67 cycles (9.6%) pour la biopsie J3, 5 cycles (7.7%) au stade blastocyste.

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) après avoir 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 procédions 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 et les embryons non transférables/non congelables pour des critères morpho-cinétiques ou suivants leur statut génétique sont systématiquement ré-analysés par PCR pour les indications de biologie moléculaire. 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 biospsiés 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 après transfert frais.

Toujours pour respecter la balance bénéfico-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 après biopsie J5.

Nos effectifs très réduits dans le groupe des biopsies J5 avec seulement 12 cycles avec transferts frais rendent difficilement comparable 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 avec transfert frais que dans le groupe des biopsies J3. Or, il est admis que la présence d'anomalies chromosomiques structurales 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]. A l'inverse, les transferts d'embryons congelés après biopsie J5 concernaient majoritairement des indications moléculaires alors que les transferts d'embryons congelés après biopsie J3 concernaient des indications cytogénétiques.

Par ailleurs, Ubaldi [42] a décrit que le choix électif de l'embryon à transférer parmi les embryons euploïdies à l'aide de caractéristiques morphocinétiques 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

dévitriifié 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 biopsie. 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 décrit comme protecteur avant vitrification du collapsus entraîné par la réalisation de la brèche, suivi de l'éclosion partielle ou totale du blastocyste biopsié, permettant 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 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 trophodermes.

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-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 ou 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 β -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 trophoctoderm 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 trophoctoderm 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 trophoctoderm 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.