Université de Bourgogne

UFR des Sciences de Santé

Circonscription Médecine

ANNEE 2020

N°

ANALYSE ET QUANTIFICATION DES CONTRIBUTIONS MATERNELLES ET PATERNELLES AUX PREMIERES ETAPES DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE : ETUDE EN SYSTEME TIME-LAPSE

ANALYSIS AND QUANTIFICATION OF FEMALE AND MALE CONTRIBUTIONS TO THE FIRST STAGES OF EMBRYONIC DEVELOPMENT: STUDY FROM A TIME LAPSE SYSTEM

THESE

Présentée

à l'UFR des Sciences de Santé de Dijon
Circonscription Médecine

et soutenue publiquement le

9 octobre 2020

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par BARRY Fatima

Née le 19 août 1992

A Annecy (74)

Université de Bourgogne

UFR des Sciences de Santé

Circonscription Médecine

AVERTISSEMENT

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

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur.

Ceci implique une obligation de citation et de référencement dans la rédaction de vos travaux.

D'autre part, toutes contrefaçons, plagiats, reproductions illicites encourent une poursuite pénale.

De juridiction constante, en s'appropriant tout ou partie d'une œuvre pour l'intégrer dans son propre document, l'étudiant se rend coupable d'un délit de contrefaçon (au sens de l'article L.335.1 et suivants du code de la propriété intellectuelle). Ce délit est dès lors constitutif d'une fraude pouvant donner lieu à des poursuites pénales conformément à la loi du 23 décembre 1901 dite de répression des fraudes dans les examens et concours publics.

Université de Bourgogne

UFR des Sciences de Santé

Circonscription Médecine

ANNEE 2020

N°

ANALYSE ET QUANTIFICATION DES CONTRIBUTIONS MATERNELLES ET PATERNELLES AUX PREMIERES ETAPES DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE : ETUDE EN SYSTEME TIME-LAPSE

ANALYSIS AND QUANTIFICATION OF FEMALE AND MALE CONTRIBUTIONS TO THE FIRST STAGES OF EMBRYONIC DEVELOPMENT: STUDY FROM A TIME LAPSE SYSTEM

THESE

Présentée

à l'UFR des Sciences de Santé de Dijon

Circonscription Médecine

et soutenue publiquement le

9 octobre 2020

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par BARRY Fatima

Née le 19 août 1992

A Annecy (74)

Université de Bourgogne

UFR des Sciences de Santé

Circonscription Médecine

Année Universitaire 2020-2021
au 1er **Septembre 2020**

Doyen :	**M. Marc MAYNADIÉ**
Assesseurs :	M. Pablo ORTEGA-DEBALLON Mme Laurence DUVILLARD

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

			Discipline
M.	Jean-Louis	**ALBERINI**	Biophysiques et médecine nucléaire
M.	Sylvain	**AUDIA**	Médecine interne
M.	Marc	**BARDOU**	Pharmacologie clinique
M.	Jean-Noël	**BASTIE**	Hématologie - transfusion
M.	Emmanuel	**BAULOT**	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Christophe	**BEDANNE**	Dermato-vénéréologie
M.	Yannick	**BEJOT**	Neurologie
Mme	Christine	**BINQUET**	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M.	Philippe	**BONNIAUD**	Pneumologie
M.	Alain	**BONNIN**	Parasitologie et mycologie
M.	Bernard	**BONNOTTE**	Immunologie
M.	Olivier	**BOUCHOT**	Chirurgie cardiovasculaire et thoracique
M.	Belaid	**BOUHEMAD**	Anesthésiologie - réanimation chirurgicale
M.	Alexis	**BOZORG-GRAYELI**	Oto-Rhino-Laryngologie
M.	Alain	**BRON**	Ophtalmologie
M.	Laurent	**BRONDEL**	Physiologie
Mme	Mary	**CALLANAN (WILSON)**	Hématologie type biologique
M.	Patrick	**CALLIER**	Génétique
Mme	Catherine	**CHAMARD-NEUWIRTH**	Bactériologie - virologie; hygiène hospitalière
M.	Pierre-Emmanuel	**CHARLES**	Réanimation
M.	Jean-Christophe	**CHAUVET-GELINIER**	Psychiatrie d’adultes, Addictologie
M.	Nicolas	**CHEYNEL**	Anatomie
M.	Alexandre	**COCHET**	Biophysique et médecine nucléaire
M.	Luc	**CORMIER**	Urologie
M.	Yves	**COTTIN**	Cardiologie
M.	Charles	**COUTANT**	Gynécologie-obstétrique
M.	Gilles	**CREHANGE**	Oncologie-radiothérapie
Mme	Catherine	**CREUZOT-GARCHER**	Ophtalmologie
M.	Frédéric	**DALLE**	Parasitologie et mycologie
M.	Alexis	**DE ROUGEMONT**	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
M.	Hervé	**DEVILLIERS**	Médecine interne
M.	Serge	**DOUVIER**	Gynécologie-obstétrique
Mme	Laurence	**DUVILLARD**	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Olivier	**FACY**	Chirurgie générale
Mme	Laurence	**FAIVRE-OLIVIER**	Génétique médicale
Mme	Patricia	**FAUQUE**	Biologie et Médecine du Développement
Mme	Irène	**FRANCOIS-PURSSELL**	Médecine légale et droit de la santé
M.	François	**GHIRINGHELLI**	Cancérologie
M.	Pierre Grégoire	**GUINOT**	Anesthésiologie – réanimation chirurgicale
M.	Frédéric	**HUET**	Pédiatrie
M.	Pierre	**JOUANNY**	Gériatrie
M.	Sylvain	**LADOIRE**	Histologie
M.	Gabriel	**LAURENT**	Cardiologie
M.	Côme	**LEPAGE**	Hépato-gastroentérologie

M.	Romaric	**LOFFROY**	Radiologie et imagerie médicale
M.	Luc	**LORGIS**	Cardiologie
Mme	Marjolaine	**GEORGES**	Pneumologie
M.	Jean-Francis	**MAILLEFERT**	Rhumatologie
M.	Cyriaque Patrick	**MANCKOUNDIA**	Gériatrie
M.	Sylvain	**MANFREDI**	Hépato-gastroentérologie
M.	Laurent	**MARTIN**	Anatomie et cytologie pathologiques
M.	David	**MASSON**	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Marc	**MAYNADIÉ**	Hématologie – transfusion
M.	Marco	**MIDULLA**	Radiologie et imagerie médicale
M.	Thibault	**MOREAU**	Neurologie
Mme	Christiane	**MOUSSON**	Néphrologie
M.	Paul	**ORNETTI**	Rhumatologie
M.	Pablo	**ORTEGA-DEBALLON**	Chirurgie Générale
M.	Pierre Benoit	**PAGES**	Chirurgie thoracique et vasculaire
M.	Jean-Michel	**PETIT**	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Christophe	**PHILIPPE**	Génétique
M.	Lionel	**PIROTH**	Maladies infectieuses
Mme	Catherine	**QUANTIN**	Biostatistiques, informatique médicale
M.	Jean-Pierre	**QUENOT**	Réanimation
M.	Patrick	**RAY**	Médecine d'urgence
M.	Patrick	**RAT**	Chirurgie générale
M.	Jean-Michel	**REBIBOU**	Néphrologie
M.	Frédéric	**RICOLFI**	Radiologie et imagerie médicale
M.	Paul	**SAGOT**	Gynécologie-obstétrique
M	Maxime	**SAMSON**	Médecine interne
M.	Emmanuel	**SAPIN**	Chirurgie Infantile
M.	Emmanuel	**SIMON**	Gynécologie-obstétrique
M.	Éric	**STEINMETZ**	Chirurgie vasculaire
Mme	Christel	**THAUVIN**	Génétique
M.	Benoit	**TROJAK**	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
M.	Pierre	**VABRES**	Dermato-vénéréologie
M.	Bruno	**VERGÈS**	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Narcisse	**ZWETYENGA**	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

PROFESSEURS EN SURNOMBRE

M.	Alain	**BERNARD** (surnombre jusqu'au 31/08/2021)	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M.	Pascal	**CHAVANET** (Surnombre jusqu'au 31/08/2021)	Maladies infectieuses

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES MEDICALES

			Discipline Universitaire
Mme	Lucie	**AMOUREUX BOYER**	Bactériologie
Mme	Louise	**BASMACIYAN**	Parasitologie-mycologie
Mme	Shaliha	**BECHOUA**	Biologie et médecine du développement
M.	Mathieu	**BLOT**	Maladies infectieuses
M.	Benjamin	**BOUILLET**	Endocrinologie
Mme	Marie-Claude	**BRINDISI**	Nutrition
Mme	Marie-Lorraine	**CHRETIEN**	Hématologie
Mme	Vanessa	**COTTET**	Nutrition
M.	Damien	**DENIMAL**	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Ségolène	**GAMBERT**	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Françoise	**GOIRAND**	Pharmacologie fondamentale
M.	Charles	**GUENANCIA**	Physiologie
Mme	Agnès	**JACQUIN**	Physiologie
M.	Alain	**LALANDE**	Biophysique et médecine nucléaire
M.	Louis	**LEGRAND**	Biostatistiques, informatique médicale
Mme	Stéphanie	**LEMAIRE-EWING**	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Pierre	**MARTZ**	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Alain	**PUTOT**	Gériatrie
M.	Paul-Mickaël	**WALKER**	Biophysique et médecine nucléaire

PROFESSEURS EMERITES

M.	Laurent	**BEDENNE**	(01/09/2017 au 31/08/2020)
M.	Jean-François	**BESANCENOT**	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	Bernard	**BONIN**	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	François	**BRUNOTTE**	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	Jean-Marie	**CASILLAS-GIL**	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	Philippe	**CAMUS**	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Jean	**CUISENIER**	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Jean-Pierre	**DIDIER**	(01/11/2018 au 31/10/2021)
Mme	Monique	**DUMAS**	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Claude	**GIRARD**	(01/01/2019 au 31/08/2022)
M.	Maurice	**GIROUD**	(01/09/2019 au 31/12/2021)
M.	Patrick	**HILLON**	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	François	**MARTIN**	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Henri-Jacques	**SMOLIK**	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Pierre	**TROUILLOUD**	(01/09/2020 au 31/08/2023)

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

Mme	Katia	**MAZALOVIC**	Médecine Générale
Mme	Claire	**ZABAWA**	Médecine Générale

PROFESSEURS ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

M.	Didier	**CANNET**	Médecine Générale
M.	Arnaud	**GOUGET**	Médecine Générale
M.	François	**MORLON**	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

M.	Jérôme	**BEAUGRAND**	Médecine Générale
M.	Clément	**CHARRA**	Médecine Générale
Mme	Anne	**COMBERNOUX -WALDNER**	Médecine Générale
M.	Benoit	**DAUTRICHE**	Médecine Générale
M.	Alexandre	**DELESVAUX**	Médecine Générale
M.	Rémi	**DURAND**	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

M.	Didier	**CARNET**	Anglais
Mme	Catherine	**LEJEUNE**	Pôle Epidémiologie
M.	Gaëtan	**JEGO**	Biologie Cellulaire

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme	Marianne	**ZELLER**	Physiologie

PROFESSEURS AGREGES de L'ENSEIGNEMENT SECONDAIRE

Mme	Marceline	**EVRARD**	Anglais
Mme	Lucie	**MAILLARD**	Anglais

PROFESSEURS CERTIFIES

Mme	Anaïs	**CARNET**	Anglais
M.	Philippe	**DE LA GRANGE**	Anglais

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

M.	Mathieu	**BOULIN**	Pharmacie clinique
M.	François	**GIRODON**	Sciences biologiques, fondamentales et cliniques
Mme	Evelyne	**KOHLI**	Immunologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES
PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

M.	Philippe	**FAGNONI**	Pharmacie clinique
M.	Marc	**SAUTOUR**	Botanique et cryptogamie
M.	Antonin	**SCHMITT**	Pharmacologie

Université de Bourgogne

UFR des Sciences de Santé

Circonscription Médecine

L'UFR des Sciences de Santé de Dijon, Circonscription Médecine, déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

COMPOSITION DU JURY

Président : Professeur Patricia FAUQUE

Membres : Professeur Christine BINQUET
Professeur Patrick CALLIER
Docteur Céline BRUNO
Docteur Julie BARBERET

SERMENT D'HIPPOCRATE

"Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

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

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

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

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque."

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Patricia FAUQUE,

Professeur des universités – Praticien Hospitalier, Laboratoire de Biologie de la Reproduction, CHU de Dijon

Après m'avoir accueillie dans votre service, vous me faites l'immense honneur de présider le jury de cette thèse. J'ai pu apprécier la qualité des conseils bienveillants que vous m'avez prodigués. Veuillez trouver ici le témoignage de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Céline BRUNO

Praticien Hospitalier, Laboratoire de Biologie de la Reproduction, CHU de Dijon

Je te suis reconnaissante de m'avoir accordé ta confiance et confié ce travail. Un grand merci pour ton implication sans faille et tes conseils sur lesquels j'ai toujours pu compter ; tu as cultivé en moi l'appétence pour la recherche dans notre magnifique spécialité. J'espère sincèrement avoir encore l'occasion de collaborer avec toi. Et surtout merci pour ton indéfectible amitié.

A Madame le Professeur Christine BINQUET

Professeur des universités – Praticien Hospitalier en Epidémiologie, CHU de Dijon

Merci pour votre investissement dans ce projet ainsi que pour celui du Master Recherche. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Patrick CALLIER

Professeur des universités – Praticien Hospitalier en Génétique, CHU de Dijon

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de m'avoir fait bon accueil dans le laboratoire de Cytogénétique.

A Madame le Docteur Julie BARBERET

Praticien Hospitalo-Universitaire, Laboratoire de Biologie de la Reproduction, CHU de Dijon

Tu as guidé mes premiers pas dans le service avec beaucoup de patience, et pour cela, je t'en remercie sincèrement. J'espère avoir la faculté de transmettre les aspects de notre spécialité comme tu as su le faire.

A l'équipe du centre d'Assistance Médicale à la Procréation du CHU de Dijon

Merci à Sara et Elodie, travailler à vos côtés a été un plaisir, je vous souhaite le meilleur.

Merci aux merveilleuses gynécologues Céline, Cécile, Mathilde, Perrine, pour votre gentillesse et votre enthousiasme

Merci à tous les techniciens du laboratoire pour la formation que vous m'avez prodiguée, j'ai beaucoup appris à vos côtés.

Merci à l'équipe formidable des sages-femmes, votre amitié et sollicitude m'ont beaucoup touché.

Merci à mes cointernes de choc Jean, Maïté, Fadoua, Amélie, Marie pour nos bons moments passés ensemble ☺

A la grande famille du PTB

Merci pour tous les SUPERS moments passés ensemble <3

Les meilleurs internes de bio de France sont à Dijon

Vous allez me manquer !

Merci à tous les techniciens du PTB pour leur précieuse formation

A Mathilde, Elise, Laurence

Les amis sont la famille qu'on a choisie, merci de faire partie de la mienne.

A ma famille : Maman, Farès et Gabriel, Jola, Dagmarka, Mateusz et Asia

Merci d'être à mes côtés à chaque instant, je vous aime tellement fort

TABLE DES MATIERES

Table des tableaux

Table des figures

Liste des abréviations

ADN Acide DésoxyriboNucléique

AMP Assistance Médicale à la Procréation

BMI Body Mass Index

FIV Fécondation *in vitro*

ICC Intraclass Correlation Coefficient

ICSI Intra Cytoplasmic Sperm Injection

IMC Indice de Masse Corporelle

TL-DO Time Lapse Donor Oocytes

TL-DS Time Lapse Donor Sperm

TLS Time Lapse System

WHO World Health Organization

PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

Depuis longtemps, un paradigme largement admis considère que le potentiel de développement précoce de l'embryon reposerait sur la qualité ovocytaire et sa compétence au développement (Braude *et al.*, 1988) tandis que les facteurs paternels n'auraient pas ou peu d'incidence sur ce développement avant l'activation du génome embryonnaire. Néanmoins, l'avènement de la technique d'ICSI (injection intra cytoplasmique de spermatozoïde) a permis aux hommes ayant une forte altération des paramètres spermatiques de concevoir, sans qu'on connaisse précisément les conséquences à long terme sur la descendance. Ainsi, identifier les facteurs pouvant se répercuter sur la genèse précoce de l'embryon représente un enjeu majeur dans la pratique de l'Assistance Médicale à la Procréation (AMP).

Actuellement de plus en plus d'études portent sur le rôle du spermatozoïde et certaines ont souligné l'influence des facteurs masculins sur le développement embryonnaire et les issues cliniques, remettant en question le dogme qui place l'ovocyte comme seul déterminant des premières étapes du développement embryonnaire. En effet, des facteurs génétiques ou épigénétiques liés au sperme tels que l'immaturité de la chromatine, un ratio protamines P1:P2 altéré ou la présence de cassures double brin ont été rapportés comme pouvant impacter la qualité embryonnaire précoce (Carrell and Hammoud, 2010; Colaco and Sakkas, 2018; Sakkas *et al.*, 1998; Seli *et al.*, 2004).

Récemment, l'essor du système d'incubation avec suivi en time lapse a permis d'obtenir de nouveaux paramètres morphocinétiques du développement embryonnaire préimplantatoire. Cependant, il est montré que la cinétique n'est pas superposable d'un laboratoire à un autre et peut varier en fonction de très nombreux facteurs. En effet, il a été rapporté que des paramètres extrinsèques comme le type de protocole de stimulation (Gryshchenko *et al.*, 2014; Gurbuz *et al.*, 2016; Muñoz *et al.*, 2013), la technique d'insémination ovocytaire (Bodri *et al.*, 2015; Cruz *et al.*, 2013), le type de milieu de culture (Ciray *et al.*, 2012) ou la concentration en oxygène (Kirkegaard *et al.*, 2013) seraient susceptibles de modifier la cinétique embryonnaire de développement. Ceci pourrait expliquer les résultats disparates observés sur les quelques études ayant examiné les effets des facteurs intrinsèques aux parents sur le développement embryonnaire précoce en time-lapse.

En effet, si certains auteurs montrent que les paramètres morphocinétiques sont retardés avec l'âge maternel avancé (Akhter and Shahab, 2017; Faramarzi *et al.*, 2019) ou chez les femmes obèses (Bartolacci *et al.*, 2019; Leary *et al.*, 2015); d'autres études récentes n'aboutissent pas à ces conclusions (Gryshchenko *et al.*, 2014; Sacha *et al.*, 2020; Warshaviak *et al.*, 2019).

De même, l'origine du sperme (testiculaire, épididymaire ou éjaculé) (Buran *et al.*, 2019; Desai *et al.*, 2018; Scarselli *et al.*, 2018) ou les paramètres du spermogramme (mobilité, morphologie, fragmentation de l'ADN) (Esbert *et al.*, 2018; Nikolova *et al.*, 2020) pourraient modifier la cinétique de développement embryonnaire mais le type d'impact (allongement ou raccourcissement des évènements morphocinétiques) diffère entre les travaux. Cette discordance peut s'expliquer par la complexité d'établir des modèles ajustés, compte tenu des nombreux facteurs de confusion potentiels. La majorité des études se concentrent sur un paramètre unique comme l'âge et se limitent à une analyse univariée ou encore comme le souligne Kirkegaard et *al* (Kirkegaard *et al.*, 2016) sans évaluer le risque de considérer les embryons de chaque patient comme des observations dépendantes de l'origine de l'embryon, ce qui pourrait surestimer la présence de différences significatives.

Notre étude a eu pour but d'évaluer à la fois la contribution des aspects maternels et paternels sur les premiers stades de développement, et identifier les facteurs parentaux susceptibles d'influencer la cinétique embryonnaire précoce. Nous avons ainsi développé un modèle d'étude original incluant uniquement des tentatives d'ICSI réalisées dans un programme de don de gamètes où les donneurs et donneuses inclus dans l'étude ont été attribués à au moins deux couples receveurs. Ainsi, deux études ont été réalisées comme le montre la Figure 1 : le premier design (**TL-DO : Time Lapse-Donor Oocytes**) utilise des ovocytes issus de donneuses afin de limiter l'impact des effets attribuables à la femme et de mieux appréhender ceux liés aux facteurs masculins. Le second design (**TL-DS : Time Lapse-Donor Sperm**) est le "miroir" du premier car il s'appuie sur du sperme de donneurs afin de mettre en lumière les effets maternels. L'avantage de ce modèle repose d'une part sur l'homogénéité relative des populations de donneurs et de donneuses de gamètes, mimant un groupe "contrôle", et également sur l'homogénéité des conditions de culture embryonnaire et de stimulation ovarienne limitant ainsi considérablement l'impact de potentiels facteurs confondants.

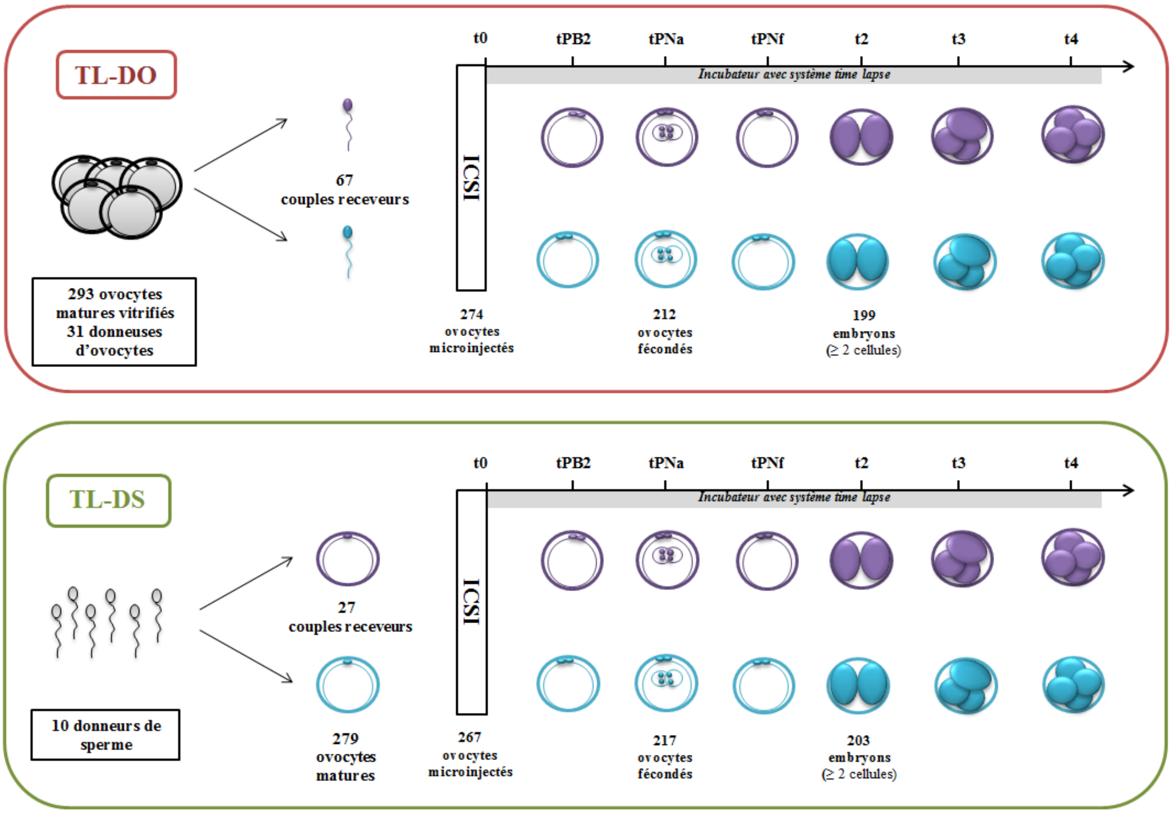


Figure 1 Designs de TL-DO et TL-DS
TL-DO (Time Lapse – Donor Oocytes) TL-DS (Time Lapse – Donor Sperm)

La combinaison de ce design avec une analyse statistique innovante reposant sur une analyse de la variance nous a permis de quantifier pour la première fois l'apport du versant féminin et celui du versant masculin sur les 48 premières heures de la morphocinétique embryonnaire. Les résultats confirment l'importance de la contribution féminine dès la fécondation puis sur les premières divisions du zygote.

Par la suite, une analyse multivariée réalisée sur la moyenne des premiers temps du développement nous a donné la possibilité d'évaluer précisément si des facteurs spécifiques maternels ou paternels pouvaient modifier la cinétique embryonnaire, et ceci, indépendamment de potentiels facteurs de confusion tels que l'âge, l'IMC (indice de masse corporelle), le statut tabagique de la femme et de l'homme ou encore le protocole de stimulation. Nos résultats mettent en évidence un temps tPNa significativement augmenté chez les femmes avec un IMC ≥ 30 kg/m² tandis que l'oligozoospermie avait tendance à être associée à des temps plus longs. Les résultats de notre étude sont présentés dans l'article suivant intitulé « Analysis and quantification of female and male contributions to the first stages of embryonic development : study from a time lapse system », actuellement en cours de soumission dans la revue internationale Human Reproduction.

CORPS DE L'ARTICLE

Title

Analysis and quantification of female and male contributions to the first stages of embryonic development: study from a Time-Lapse system.

Running title:

Respective parental effects on early Human embryonic development

Authors:

Céline Bruno, M.D., Ph.D [a*], Abderrahmane Bourredjem [c], Fatima Barry [a], Magali Guilleman [a], Bruno Chamoy [a], Isabelle Hance [b] Cécile Choux, M.D., Ph.D [b], Paul Sagot, M.D [b], Christine Binquet, M.D., Ph.D [c], Julie Barberet, Pharm.D [a], Patricia Fauque, M.D., Ph.D.[a]

[a] Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Hôpital François Mitterrand, Université de Bourgogne, Dijon, France ;

[b] Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital François Mitterrand, Université de Bourgogne, Dijon, France ;

[c] USMR, Dijon University Hospital, F-21000, Dijon, France;

*Corresponding author: Céline Bruno, M.D., Ph.D.

E-mail address: celine.bruno@chu-dijon.fr

Laboratoire de Biologie de la Reproduction

CHU Dijon - BP 77908

14 rue Gaffarel

21079 DIJON CEDEX

Phone: +33-3-80-29-50-31

Fax: +33-3-80-29-51-16

Abstract

Study question: Does early human embryonic development depend solely on female contribution?

Summary answer: Female effects remain determinant for the first cleavages (almost 30 and 10 times more for t2 and t4, respectively), but lower than male for t3.

What is known already: Recently, new findings have underlined the influence of male factors on IVF and obstetric outcomes, casting doubt on the dogma that early embryo development depends exclusively on oocyte maturity. The few studies that examined the effect of male and/or female features on early embryo development, notably using the Time-Lapse system (TLS), reported conflicting results. This can be explained by the restricted number of studies using adapted models as donors' program or multivariate analyses.

Study design, size, duration: We used two original designs to study female or male effects on embryonic development: 1/ based on embryos from vitrified donor oocytes (TL-DO), 2/ from cryopreserved donor sperm (TL-DS). In these two cases, each donor was matched with at least two couples. Firstly, we quantified the "parental" role using an ad hoc Intraclass Correlation Coefficient (ICC) and completed with a multivariate analysis to assess age, BMI (Body Mass Index) of partners and sperm parameters effects.

Participants/materials, setting, methods: A total of 572 mature oocytes (TL-DO: 293 from 31 oocyte donors and 67 men; TL-DS: 279 from 10 sperm donors and 27 women), fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and incubated in a TLS (Embryoscope®) were included in these two analyses from March 2013 to April 2019; 429 fertilized oocytes (TL-DO: 212 & TL-DS: 217) and 402 embryos (TL-DO: 199 & TL-DS: 217) were assessed. Outcomes were times (in hours) of pronuclei apparition (tPNa) and fading (tPNf); the times to 2,3 and 4 cells respectively t2, t3, t4; and the periods cc2 (t3-t2) and s2 (t4-t3).

Main results and the role of chance:

The variability in the different times estimated due to female variance were significant for almost all timings: [ICC in (DO-DS) designs respectively: tPB2 (8-18%); tPNa (16-21%); tPNf (40-25%); t2 (38-24%); t3 (14-20%); t4 (21-32%); cc2 (9-0%); s2 (0-5%)]. Comparatively, the effects of male variance were lower, except for t3: [ICC in (DO-DS) designs respectively: tPB2 (0-0%); tPNa (0-0%); tPNf (0-6%); t2 (2-0%); t3 (25-6%); t4 (2-2%); cc2 (21-4%); s2 (3-0%)]. After multivariate analyses in TL-DO design, the time of tPNa increased significantly for women with BMI $\geq$ 30 kg/m² (tPNa: +1.49h, 95%CI [+0.20; +2.79]; p=0.025) and oligozoospermia was associated with a tendency to increased timings: tPNf (+1.46h, 95%CI [-0.14; +3.06]; p=0.073); t2 (+1.77h, 95%CI [-0.01; +3.56]; p=0.052); t3 (+2.20h, 95%CI [-0.38 ; +4.77]; p=0.093); t4 (+2.14h, 95%CI [-0.01; +4.30]; p=0.052).

Limitations, reasons for caution:

Our analyses were based on selected population (i.e. young and healthy donors) and embryos were assessed until day 2, our findings cannot be generalized to embryos cultured up to the blastocyst stage.

Wider implications of the findings:

This study quantifies and highlights the role of the oocyte in the first stages of embryo kinetics, but it also found that sperm comes into play as soon as the first cleavage, maybe even since pronuclei disappearance. Other underlying effects such as epigenetic or genetic factors could be involved in these findings.

Study funding/competing interest(s) (option): none

Keywords: embryo development / time lapse / male effect / female effect / morphokinetics

Introduction

Traditional paradigms consider embryo developmental potential to be based on oocyte competency at least for the early stages while paternal contribution is widely unknown/limited (Braude *et al.*, 1988). Recently, new findings have underlined the influence of male factors on IVF and obstetric outcomes (Carrell and Hammoud, 2010; Colaco and Sakkas, 2018; Sakkas *et al.*, 1998), casting doubt on the dogma that early embryo development depends exclusively on oocyte maturity, and have challenged on the role of spermatozoa in the future health of ART children. Converging studies focused on the first events occurring in embryonic development, notably involving genetic or epigenetic defects (like sperm decondensed or immature chromatin, altered P1:P2 ratio, DNA strand breaks or sperm aneuploidy) may impact the quality and development of the embryo (Carrell and Hammoud, 2010; Colaco and Sakkas, 2018; Sakkas *et al.*, 1998; Seli *et al.*, 2004).

However, the few studies that have examined the effect of male and/or female features on early embryo development, using the Time-Lapse System (TLS), report conflicting results. Indeed if some authors previously showed that morphokinetic events were prolonged in older women (Akhter and Shahab, 2017; Faramarzi *et al.*, 2019), or in obese women (Bartolacci *et al*., 2019; Leary *et al*., 2015), recent studies report no evidence (Gryshchenko *et al*., 2014; Sacha *et al.*, 2020; Warshaviak *et al*., 2019; Bellver *et al*., 2013; Watcharaseranee *et al*.,2014). Similarly, sperm origin (testicular, epididymal or ejaculated sperm) (Buran *et al*., 2019; Desai *et al*., 2018; Scarselli *et al.*, 2018) or sperm parameters (motility, morphology, DNA fragmentation) (Esbert *et al.*, 2018; Nikolova *et al.*, 2020) could modify the embryo kinetic although not all authors agree on the type of kinetic impact (faster or slower depending on the studies).

These controversies can be explained by the complexity to establish adjusted models for such studies. Indeed, it has been showed that extrinsic parameters such as type of stimulation protocols (Gryshchenko *et al.*, 2014; Gurbuz *et al.*, 2016; Muñoz *et al.*, 2013), oocyte insemination techniques (Bodri *et al.*, 2015; Cruz *et al.*, 2013), type of culture media (Ciray *et al.*, 2012) or oxygen concentration (Kirkegaard *et al.*, 2013) report influence on embryos kinetics. Most authors focused their investigation on only one parameter, such as female or male age (Sagi-Dain *et al.*, 2015) using univariate analysis and forgetting the potential multifactorial effects of both partners in early embryo development. Moreover, most of studies have treated embryos from each patient as independent observations, taking the risk of overestimating the statistical significance of potential correlations (Kirkegaard *et al.*, 2016).

Our study aimed to assess and quantify to the contribution of both male and female aspects in early embryo development and identify potential factors impacting the different kinetic stages. In order to address this issue, we developed an original model including two designs simultaneously: the first using oocytes from donors (TL-DO : Time Lapse-Donor Oocytes) to limit the female effects and to better analyze the paternal effects. The second, designed “in mirror”, using sperm from donors (TL-DS : Time Lapse-Donor Sperm) allowed us to evaluate the female effects. To enhance the control effect by using donor programs, we included only donors who were assigned to at least two different couples. For the first time, we proposed to quantify the general impact of male and female contribution on early embryo morphokinetics by performing variability analysis. Subsequently, multivariate analysis allowed us to identify specific male or female factors that could influence key stages of developmental kinetics, independently of potential confounding factors.

Materials and Methods

Study design and population

This retrospective study is based on two original designs, including embryos from vitrified donor oocytes in TL-DO and embryos from sperm donor in TL-DS. Each donor included has been previously assigned to at least 2 recipient couples, allowing us to study independently the effect of male and female factors on early embryo development.

A total of 572 mature oocytes were included following 115 cycles, leading to 429 fertilized oocytes and 402 embryos were incubated in a Time Lapse imaging system (Embryoscope®, Unisense FertiliTech) from March 2013 to April 2019 at the University Hospital of Dijon. Both designs are presented in Figure 1bis.

In the **TL-DO design** (Figure 1bis), 293 vitrified oocytes from 31 oocyte donors were thawed; 212 of them were fertilized with sperm from 67 men by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and resulted in 199 embryos. Oocyte donors were women aged 36 and less, in good general health. Ninety percent of oocyte donors (n=28) had children before. Allocation of oocytes donors was carried out according to main physical characteristics between the donor and the recipient. In most cycles (70%), four oocytes were assigned for each couple. For 80% of couples (54/67), a single allocation was performed. Eleven couples received oocytes from 2 donors whereas 2 couples received oocytes from 3 donors. Among oocyte donors, 18 of them (58%) had been associated with 2 recipient couples, while the others had been associated with 3 to 6 recipient couples. On average in TL-DO, 4.2 mature oocytes and a mean of 2.5 embryos were obtained for each attempt.

In the **TL-DS design** (Time Lapse – Donor Sperm), 279 “fresh” oocytes were obtained in 27 women after ovarian stimulation and 217 of them were fertilized with 10 sperm donors, resulting in 203 embryos. Sperm donors were aged 44 and less, in good general health; and all of them had had children before. All of them had a BMI < 30 kg/m² and supposedly nonsmokers (despite 4 missing data). Three of them (30%) were oligozoospermic. Five sperm donors (50%) were allocated to 2 recipient couples, 3 donors to 3 recipient couples and the others to 4 and 5 couples. The number of mature oocytes retrieved from each of the 27 women included varied greatly between 2 to 24. The 2 main indications of sperm donation were non obstructive azoospermia (NOA) (59%) and Klinefelter syndrome (15%). The infertility was of mixed origin for 20 recipient couples (74%) and most couples (n=24; 89%) suffered from primary infertility.

The information used in the study was collected for clinical care. According to French Public Health Law, non-interventional studies on humans do not require approval from Institutional Review Board or written consent from the participants. Nevertheless, we obtained formal confirmation that ethical approval was not required for this observational study.

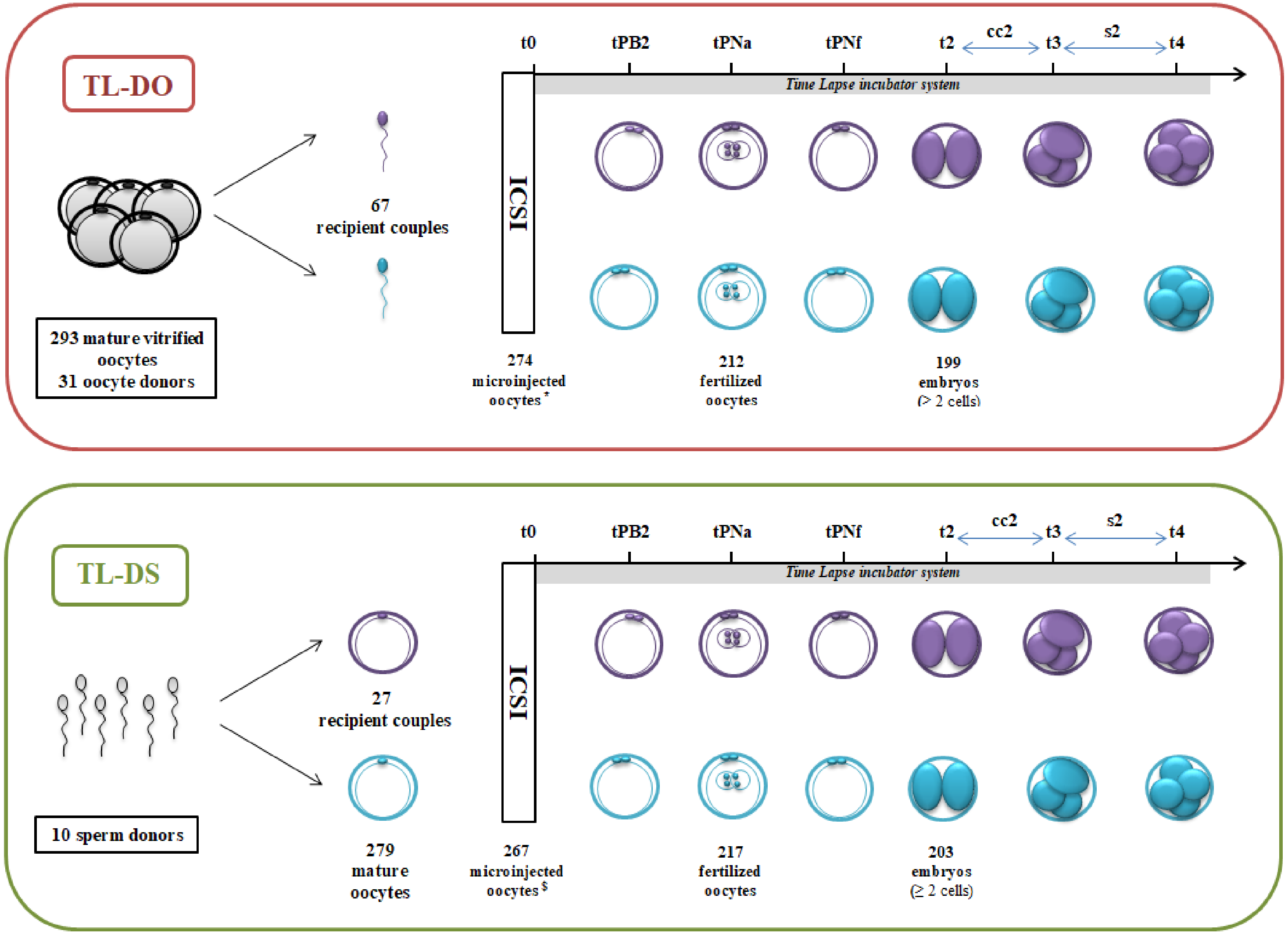


Figure 1bis TL-DO and TL-DS designs

TL-DO (Time Lapse – Donor Oocytes) TL-DS (Time Lapse – Donor Sperm)

* mature oocyte intact after thawing and microinjection $ mature oocyte intact after microinjection

Each oocyte donor was allocated to at least 2 recipient couples. **t0** is the time of microinjection, following kinetic parameters were assessed : the time of second polar body' expulsion (**tPB2)**, the time of pronuclei appearance and disappearance (respectively **tPNa** and **tPNf**), time to two, three, or four blastomeres (**t2, t3, t4**), **s2**= t4-t3, **cc2** = t3-t2.

Ovarian stimulation and oocyte retrieval

The controlled ovarian stimulation protocols consisted in antagonist for oocytes donors in TL-DO, and in either long GnRH agonist (76%), short GnRH agonist down-regulation (9%) or antagonist protocols (15%) in TL-DS, depending on women age and ovarian reserve. The short agonist protocol was preferred for patients with an expected low ovarian response while the antagonist protocol was used to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. A single injection of hCG (Ovitrelle™, Merck Serono) or GnRH agonist (Decapeptyl® 0,2mg) was administered to induce final follicular maturation. Oocyte retrieval was performed by transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration 36 hours after hCG injection.

Oocyte preparation and vitrification

The oocyte–cumulus complexes were denuded one hour after retrieval using hyaluronidase (Fertipro™, Belgium). In TL-DO, mature oocytes from donors were vitrified about 2h after denudation with Vitrolife RapidVit™ Oocyte or Irvine Vit Kit Freeze™ and stored in Vitrolife Rapid-i™ straws in liquid nitrogen. In TL-DS, only fresh oocytes were included.

Sperm preparation

Sperm preparation for ICSI was performed as previously described (Barberet *et al.*, 2018). Sperm parameters (count and mobility) were determined the day of the attempt; results were expressed according to WHO (World Health Organization) recommendations (Cooper *et al.*, 2010). Donor sperms were frozen with slow freezing technique and stored in CryoBioSystem® high security straws in liquid nitrogen. Oligozoospermia was determined when sperm count inferior to 39 million per ejaculate and asthenozoospermia when sperm mobility (progressive motile spermatozoa) at 1h was inferior to 32%. Sperm morphology was determined on the last sperm analysis done in the laboratory but not the day of the attempt ; teratozoospermia was defined as less than 23% normal morphology sperm (modified David classification) (Auger *et al.*, 2000). All cycles were performed with ejaculated sperm for oocyte donors (TL-DO).and sperm selection was done by density gradient centrifugation. Sperm from donors was thawed beforehand the morning of the attempt in TL-DS design.

ICSI and embryo culture

ICSI was performed within 2 hours of oocyte retrieval/thawing on mature oocytes in TL-DS and TL-DO respectively. Inseminated oocytes were immediately transferred into pre-equilibrated Embryoslide (Unisense Fertilitech) with 25µl of culture medium (Global, LifeGlobal) under oil (Nidoil, Nidacon). Then, the Embryoslides were incubated in the EmbryoScope at 37.0°C, 6% CO2, 5% O2. Embryo development was recorded every 20 minutes in seven different focal planes. The images and related data were stored in the EmbryoViewer (Unisense FertiliTech) and subsequently analysed.

Embryo morphokinetics

In the two designs TL-DO and TL-DS, the main outcomes were the morphokinetic times described previously (Barberet *et al.*, 2019; Desch *et al.*, 2017); the exact timings were assessed in hours post micro-injection: **tPB2** represents the time of second polar body expulsion, **tPNa** and **tPNf** represents the time of pronuclei appearance and disappearance respectively. Cell stages were described as the time from ICSI to the first frame in which the membranes of the two, three, or four blastomeres were completely separated (t2, t3, t4). **s2** represents the period to complete synchronous divisions i.e the duration of the transition from a three blastomere embryo to a four blastomere embryo (s2= t4-t3). **cc2** represents the duration of the second cell cycle, as the time of division from a two blastomere embryo to a three blastomere embryo (cc2 = t3-t2). Outcomes were expressed as a mean difference in hours and limited to the first 48 hours after ICSI.

Statistical Analysis

Variance analysis

Our model including two mirror studies with donor gametes allowed for the quantification of female and male global effect on kinetic outcomes via variance analysis. Similarity between Donors and Couples was quantified using adhoc Intraclass-Correlation Coefficients (ICC) derived from a mixed effects model that incorporated fixed effects for known covariates effects on the outcome mean (like sperm numeration) and variance components (for male and female potential effects) suitable to the data structure. For each outcome, there were 3 factor levels: Female, Oocyte and Male. Oocytes were nested within Female. From Female j, (j=1,2,3..,27) were issued oocytes k, where k =1,..,nj and nj ∈ {2,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,21,24}. Oocytes were cross-classified by Male i (i = 1,2,3,..,10). Variance components models with random effects for Female *Fj* and Oocyte *Ojk* were used to account for variability attributable to Female and Oocytes within Female, respectively. The cross-classification of Oocytes by Male was addressed by including random effect H*i* for Male (Goldstein, 1987). All random effects (*Fj*, *Ojk*, *Hi*) and residual error (*Eijk*) were assumed to be independent and identically distributed (iid) with mean = 0 and variances σ_F^2, σ_O^2, σ_H^2, and σ_E^2, respectively. For each kinetic outcome (*Xijk*), tPB2, tPNa, tPNf, t2, t3, t4, cc2 and s2, variance components were estimated from the following multilevel mixed model:

$$X_{ijk} = \mu + Hi + Fj + Ojk + Eijk \quad [1]$$

Models were fit using the REstricted Maximum Likelihood (REML) method providing asymptotically unbiased parameter estimations (Jiang, 2007). Estimates of variability attributable to Male (sperm), Female and Oocyte as a percentage of the total variability were computed for each kinetic outcome. Outcomes reproducibility was assessed using the Intraclass Correlation Coefficient (ICC), which quantify the similarity between outcome measures obtained on the same unit from different sources. The following 2 ICC were derived from equation [1] and estimated on our data:

ICC (Female) = Corr (X_{ijk} ,$X_{i'jk'}$) = $\sigma_F^2/(\sigma_H^2 + \sigma_F^2 + \sigma_O^2 + \sigma_E^2)$ to estimate the similarity in outcomes obtained on different Males (sperms) from the same Female ;

ICC (Male or Sperm) = Corr (X_{ijk} ,$X_{ij'k'}$) = $\sigma_H^2/(\sigma_H^2 + \sigma_F^2 + \sigma_O^2 + \sigma_E^2)$ to estimate the similarity in outcomes obtained on different Females from the same Male (or sperm).

The 95% confidence intervals of the ICC were computed using the delta method (Oehlert, 1992). The following ranges were used to interpret similarity as estimated by the ICC: <1% : small group effect; 1% to 5% : medium group effect; >5% : strong group effect (Bliese, 1998). All analyses were performed using SAS software version 9.4.

Multivariate analysis

Quantitative variables were expressed in terms of means ± standard deviation and in percentages for qualitative variables. The kinetics outcomes were considered as continuous variables expressed in hours, only those comprised in the first 48 hours of development were selected.

To evaluate the impact of the different factors on embryo kinetics, an additive mixed linear model with a male random effect and a female random effect was used to take into account the intra-male and intra-female correlations. The REML (REstricted Maximum Likelihood) method was used to estimate the difference between the mean of the endpoint according to the modalities of the factors (Verbeke and Molenberghs, 2009). Male parameters analysed were age, BMI, smoking status in TL-DO only, sperm count and mobility (Cooper *et al.*, 2010). Sperm morphology was not analysed as the evaluation of this parameter was performed prior to the day of ICSI, unlike sperm numeration and mobility. Analysis also considered female characteristics: age, BMI, smoking status, stimulation protocol in TL-DS and type of antagonist in TL-DO.

For the two study designs, univariate analysis was realized as a first step. To include potential confounding factors on embryo developmental kinetics, multivariate analysis was performed. Variables with p-value < 0.20 in univariate analysis were selected. Multivariate analysis was obtained after a backward selection strategy and a significance threshold at 0.10. Alpha risk was set at 0.05.

Results

Participant & attempts characteristics

Population characteristics of both TL-DO and TL-DS studies are described in Table 1.

Table 1 Population characteristics of TL-DO and TL-DS

Population characteristics	TL-DO		TL-DS	
	Male (n=67)	Oocytes Donors (n=31)	Sperm Donors (n=10)	Female (n=27)
Age (years)	36.8 ± 5.0	31.3 ± 3.6	37 ± 4.7	33.9 ± 4.5
BMI (kg/m²)	25.6 ± 3.7	24.7 ± 5.1	23.5 ± 2.5	24.3 ± 5.1
Smoking, n (%)				
Never	37 (55%)	24 (77%)	6 (60%)	17 (63%)
Yes currently	18 (27%)	7 (23%)	0	3 (11%)
Yes before	10 (15%)	0	0	7 (26%)
Status unknown	2 (3%)	0	4 (40%)	0
Sperm count (M/ejaculate)	150 ± 151.5	/	93.3 ± 85.4	/
Normozoospermia	52 (78%)	/	7 (70%)	/
Oligozoospermia	15 (22%)	/	3 (30%)	/
Sperm Mobility (%)	43.8 ± 17.3	/	49.6 ± 17.1	/
Asthenozoospermia	20 (30%)	/	1 (10%)	/
Normal mobility	47 (70%)	/	9 (90%)	/

Oocyte donors and male characteristics in TL-DO

Mean BMI of oocyte donors was 24.7±5.1 kg/m². Five of them had a BMI > 30 kg/m². Concerning sperm parameters of men included in TL-DO, 15 (22%) men were oligozoospermic and 20 (30%) had asthenozoospermia. Except 3 patients with a history of varicocele treatment, no other medical history was found among oligozoospermic patients. In total, 35 (52%) men showed sperm count and /or mobility alteration (Table 1).

Female factors and sperm donors' characteristics in TL-DS

The average sperm count was 93.3 million spermatozoa per ejaculate, 7 of the sperm donors (70%) were normozoospermic and 9 of them (90%) had normal sperm mobility (Table 1). Oligozoospermia was very moderate among the 3 sperm donors with low sperm count (33.3 ± 2.89 M/ejaculate).

Embryo kinetic timings

Embryo kinetic timings for TL-DO and TL-DS are reported in Suppl. Figure 1.

Variability analysis: quantification of the parental role

The results of the variability analysis for both TL-DO and TL-DS studies are presented in Table 2. The variability in the different times estimated due to female variance were significant for almost all timings: [(ICC in (DO-DS) designs respectively: tPB2:(8-18%); tPNa:(16-21%); tPNf:(40-25%); t2:(38-24%); t3:(14-20%); t4:(21-32%); cc2:(8-0%); s2:(0-5%)]. Thus, the correlation between two timing of the first cleavage stages obtained from the same female but with different sperms was estimated between 8% and 40%. Comparatively, the effects of male variance were lower, except for t3 and cc2 in TL-DO study: [(ICC in (DO-DS) designs respectively: tPB2:(0-0%); tPNa:(0-0%); tPNf:(0-6%); t2:(2-0%); t3:(25-6%); t4:(2-2%); cc2 (20-4%); s2(3-0%)].

Table 2 Variability analysis in TL-DO and TL-DS study, expressed as Intraclass-Correlation Coefficient (ICC)

	TL-DO		TL-DS	
Kinetic outcomes	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**
tPB2	0.09 [0 ; 0.20]	0	0.18 [0.04 ; 0.34]	0
tPNa	0.16 [0.02 ; 0.30]	0	0.21 [0.07 ; 0.36]	0
tPNf	0.40 [0.22 ; 0.57]	0	0.26 [0.06 ; 0.45]	0.06 [0 ; 0.26]
t2	0.38 [0.20 ; 0.56]	0.02 [0 ; 0.14]	0.24 [0.08 ; 0.40]	0
t3	0.15 [0 ; 0.35]	0.25 [0.04 ; 0.47]	0.20 [0 ; 0.42]	0.06 [0 ; 0.27]
t4	0.21 [0.01 ; 0.41]	0.02 [0 ; 0.25]	0.32 [0.04 ; 0.60]	0.02 [0 ; 0.26]
cc2	0.09 [0 ; 0.28]	0.21 [0.01 ; 0.40]	0	0.04 [0 ; 0.12]
s2	0	0.03 [0 ; 0.81]	0.05 [0.02 ; 0.08]	0

Results expressed as means and 95% CI
>5% : strong group effect; 1% to 5%: medium group effect, <1% : small group effect

Multivariate analysis: identification of potential parental factors

To evaluate the impact of female or male parameters on embryo kinetics, we secondly performed a multivariate analysis. The results are reported in Table 3 for TL-DO and TL-DS, respectively.

Regarding oocyte donors' characteristics, tPB2 happened significantly later the older the oocyte donor was (+0.10h, 95%CI [+0.03; +0.17]; *p=0.009*) although the difference was very slender and not observed in TL-DS study. The timing of pronuclei appearance (tPNa) increased significantly in oocytes for donors with BMI > 30kg/m², compared to those with BMI < 30kg/m² (+ 1.50h, 95%CI [+0.20; +2.79]; *p=0.025*). This difference was not observed for recipient women in TL-DS study, nevertheless, we observed that tPB2 happened later in obese women (+0.68h, 95%CI [-0.01; +1.37]; *p= 0.054*).

Concerning the impact of sperm count on embryo kinetics after multivariate analysis, we found out in TL-DO study that tPB2 occurred later in oocytes associated with oligozoospermic patients compared to embryos of normozoospermic patients: **tPB2** (+0.66h, 95%CI [+0.08; +1.25]; *p=0.026*).We observed also a tendency of longer PN appearance, fading and cleavage timings : **tPNa** (+0.30h, 95%CI [+0.62; +1.22]; *p=0.520*); **tPNf** (+1.46h, 95%CI [-0.14; +3.06]; *p=0.073*); **t2** (+1.77h, 95%CI [-0.01; +3.56]; *p=0.052*); **t3** (+2.20h, 95%CI [-0.38; +4.77]; *p=0.093*); **t4** (+2.14h, 95%CI [-0.01; +4.30]; *p=0.052*); **cc2** (+0.81h, 95%CI, [-1.57; +3.19]; *p=0.490*); **s2** (-0.17h, 95%CI [-1.31; +0.97]; *p=0.770*) for embryos issued from oligozoospermic patients. Although we observed the same trend between oligozoospermic and normozoospermic patients, no significant difference in kinetic outcomes was highlighted in TL-DS study **: tPB2** (+0.10h, 95%CI [-0.53; +0.74]; *p=0.730*); **tPNa** (+0.58h, 95%CI [-0.81; +1.96]; *p=0.400*); **tPNf** (+1.19h, 95%CI [-1.70; +4.07]; *p=0.360*); and cleavage timings **t2** (+1.66h, 95%CI [-1.04; +4.35]; *p=0.210*), **t3** (+1.88h, 95%CI [-1.24; +5.00]; *p=0.200*) and **t4** (+1.43h, 95%CI [-1.45; +4.31]; *p=0.280*]; **cc2** (+0.71h, 95%CI [-1.34; +2.77]; *p=0.450*); **s2** (-0.32h, 95%CI [-1.64; +1.00]; *p=0.570*).

Table 3 Influence of male factors and oocyte donors' characteristics on kinetics parameters from multivariate analysis in TL-DO & TL-DS studies

TL-DO	**Male factors**			**Oocyte donors characteristics**					
	Sperm count O vs N			Donor BMI$ Yes vs No			Donor Age* (years)		
Kinetic outcomes	**Diff**	**95%CI**	***p***	**Diff**	**95%CI**	***p***	**Diff**	**95%CI**	***p***
tPB2	0.66	[0.08 ; 1.25]	*0.026*				0.10	[0.03 ; 0.17]	*0.009*
tPNa	0.30*	[0.62 ; 1.22]	*0.52*	1.497	[0.20 ; 2.79]	*0.025*			
tPNf	1.46	[-0.14 ; 3.06]	*0.073*						
t2	1.77	[-0.01 ; 3.56]	*0.052*						
t3	2.20	[-0.38 ; 4.77]	*0.093*						
t4	2.14	[-0.01 ; 4.30]	*0.052*						
cc2 (t3-t2)	0.81	[-1.57 ; 3.19]	*0.49*						
s2 (t4-t3)	-0.17	[-1.31 ; 0.97]	*0.77*				0.11	[-0.01 ; 0.22]	*0.057*

TL-DS	**Sperm donors factors**			**Female characteristics**					
	Sperm count O vs N			Women BMI$ Yes vs No			Women Age* (y)		
Kinetic outcomes	**Diff**	**CI95%**	***p***	**Diff**	**CI95%**	***p***	**Diff**	**CI95%**	***p***
tPB2	0.10	[-0.53 ; 0.74]	*0.73*	0.68	[-0.01 ; 1.37]	*0.054*			
tPNa	0.58	[-0.81 ; 1.96]	*0.40*						
tPNf	1.19	[-1.70 ; 4.07]	*0.36*						
t2	1.66	[-1.04 ; 4.35]	*0.21*						
t3	1.88	[-1.24 ; 5.00]	*0.20*						
t4	1.43	[-1.45 ; 4.31]	*0.28*	2.05	[-0.62 ; 4.73]	*0.125*			
cc2 (t3-t2)	0.71	[-1.34 ; 2.77]	*0.45*				0.12	[-0.03 ; 0.27]	*0.11*
s2 (t4-t3)	-0.32	[-1.64 ; 1.00]	*0.57*						

*continuous variable, $ donor BMI ≥ 30Kg/m²

Diff: mean difference between the 2 modalities; CI95%: 95% confidence interval; O: oligozoospermic; N: normozoospermic

Discussion

Our findings in both TL-DO and TL-DS designs demonstrate the important contribution of the oocyte in the first stages of embryo kinetics, but it also finds that sperm could play a role starting since the first cleavage, with no evidence for the early steps of the fertilization stage. To our knowledge, this is the first study that reports a quantitative evaluation of the parental contribution on the early kinetic of human embryo. This assessment was made possible by combining 1/an original study design allowing an independent evaluation of parental effects with 2/an innovative statistical analysis using variability analysis permitted an estimated quantification of each parental contribution and 3/based on early embryonic kinetics data obtained from ICSI-attempts monitoring by time lapse system.

The remarkable concordance of the results of the variability analysis between TL-DO and TL-DS studies demonstrated the importance of the female contribution, while simultaneously validating the study design used. Indeed, in both TL-DO and TL-DS studies, maternal contribution seems to begin as soon as the time of second polar body expulsion (tPB2) with an effect almost 10 to 30 times greater than paternal contribution in both studies. We reported that the highest ICC representing the female effect in TL-DS is half of the value found in the TL-DO design (20% vs 40%, respectively), however if it is possible to compare paternal and maternal effect in each model, caution must be exercised when making ICC comparison between two distinct models.

In their interesting study focusing on the factors involved in the variation of kinetic parameters, Kirkegaard and *al* reported an ICC estimated to 31% involving embryo origin, defined in this study as maternal patient origin (Kirkegaard *et al.*, 2016). However, contrary to our study, they did not evaluate the paternal factors. The interpretation of ICC remains challenging, considering the lack of studies for comparison, but emphasizes a quantitative approach and opens the door to future studies in the field.

Considering the high level of maternal contribution in the early embryonic kinetic, we evaluated the main potential female factors as maternal age and maternal BMI. Surprisingly, no female intrinsic effect was clearly identified, or only as an isolated issue. Indeed, if we reported a significant difference for solely tPNa with female BMI in TL-DO study, no significant result was observed in the "control" and specific TL-DS design established to detect female factors contribution. Nevertheless, our results should be considered with caution, as little women presented a BMI >30 kg/m^2 in both designs (n=5 in TL-DO and n= 6 in TL-DS).

Maternal age is specifically considered a major factor in ART prognosis, as it reflects decrease in both the quantity and quality of the oocytes (Igarashi *et al.*, 2015), and IVF success rate decreasing considerably with advanced age (Balasch, 2010). In our study, women age did not seem to affect early embryo kinetics. These results are in line with recent studies that report no impact of maternal age on morphokinetic parameters (Gryshchenko *et al.*, 2014; Watcharaseranee *et al.*, 2014), as published by Warshaviak and *al* (Warshaviak *et al.*, 2019), on specifically IVF embryos (to rule out male factor), who show no evidence of relation in kinetics between embryos from women > 42 years old compared to younger women, even if they showed a tendency to arrested development. The significant result observed on the timing of second polar body expulsion in TL-DO did not show a major difference and was isolated; no impact of the maternal age was detected on others timings and in the specific TL-DS study. Moreover, TL-DO study was based on a control population of oocyte donors who were less than 36 years old that could limit the interpretation, contrary to TL-DS study which displayed a representative women population.

These results raise the question of the oocyte competence, that seems little influenced by women age or BMI. Oocyte competence is dependent on maturation processes, leading to mRNA storage inter alia, and is acquired through complex/critical biological transitions starting in early folliculogenesis (Conti and Franciosi, 2018). Thus, disruption of nuclear or cytoplasmic maturation mechanisms has proved to severely compromise developmental potential in early embryo development. However, determine the causes or the origins of these defects and be able to assess remains still challenging.

There is much debate in literature as to whether early embryo development is influenced exclusively by maternal factors or whether there are also paternal influence at this early stage. It is well documented that the first two embryonic cell divisions are primarily controlled by the maternal genes and paternal effects begin admittedly at the 4-cell stage (Braude *et al.*, 1988). Here, and thanks to our robust statistical analysis, we offer for the first time an estimation of the ratio of female/male influence on the early embryonic development, and contrary to the previous "genetic" reports (that concluded to a late paternal effect occurring at the 4-cell stage), we observed a moderate but relatively early paternal effect since the first cleavage (and maybe even since pronuclei fading). These observations suggest that human embryo kinetics do not rely solely on oocyte mRNA stocks.

Indeed, previous clinical studies reported that paternal defects could have an influence on early embryo development as well as the blastocyst formation including slower embryo cleavage, poor morphology, lower blastocyst formation and lower implantation rates (Janny and Menezo, 1994; Parinaud *et al.*, 1993). For example, Tesarik and *al* investigated the adverse paternal effect on embryo development and they propose the existence of a presumptive "early paternal effect" that could manifest as soon as the zygote stage and explain following delayed cleavage divisions (Tesarik *et al*., 2005), they suggest a lack of functional oocyte activating factor or eventual gene expression disturbances as an explanation. Existence of sperm transcripts in embryonic development was suggested by Krawetz and colleagues (Krawetz *et al.*, 2011), who showed in their experimental study that paternal messenger RNA is delivered to the oocytes at fertilization (Ostermeier *et al.*, 2004).

Interestingly, we found a tendency for delayed kinetics in embryos issued from oligozoospermic patients in TL-DO, starting from tPB2 and until more than 2 hours of differences for t4. We noticed that these results were not observed in TL-DS, probably because of the low number of oligozoospermic donors included in TL-DS. During the last decade, oligozoospermia has been associated with DNA methylation defects (Boissonnas *et al.*, 2010; Hammoud *et al.*, 2010; Houshdaran *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2007; Laurentino *et al.*, 2015; Marques *et al.*, 2008; Montjean *et al.*, 2013, 2015; Poplinski *et al.*, 2010; Santi *et al.*, 2017; Sato *et al.*, 2011) and with improper histone to protamine replacement (Bowdin *et al.*, 2007; Carrell and Hammoud, 2010; Marques *et al.*, 2004, 2008). Moreover, numerous studies have reported that alterations of sperm chromatin configuration as well as high sperm DNA fragmentation could lead to poor embryo development (Colaco and Sakkas, 2018).

Another explanation of the delayed timings observed in the embryos kinetic issued of oligozoospermic patients could be the consequences of setting up of chromatin repaired mechanism occurring during the first steps of the embryo reprogramming. Indeed, during the pronuclei fading process, a deep epigenetic reprograming and nuclear reorganization take place, mostly for paternal sperm protamines which are exchanged for maternal nucleosomes and it have been reported that when sperm with altered Histone-Protamine Ratio values is utilized in an ART procedure, it could result in desynchronized paternal genomic expression that alters preimplantation embryo development (Braude *et al.*, 1988; Laurentino *et al.*, 2015).

The deep interest of our study lies on the methodology used and its design based on a “control population” to assess independently the parental contribution on the kinetic of Human embryo. However, this innovative evaluation constrained the size of our population. Moreover, our available data of embryos kinetics forced us to restrict the assessment on the first 48 hours of the embryonic development, limiting the exploration to the blastocyst stage and the potential evolution of kinetic after the embryonic genome activation. Without any context and in view of literature, it would also have been very interesting to be able to evaluate the sperm chromatin structure: sperm DNA methylation and/or sperm DNA fragmentation to assess their potential implication. Moreover, broaden the analyses to pregnant issues is another attractive perspective; nonetheless, it would have implied to integrate in the multivariate analysis the potential confounding factors occurring in implantation that could largely decrease the power of the study.

The dogma, largely based on empirical genetic reports, according to which early embryonic development depends solely on the maternal contribution, seems to be collapsing which is increasingly reopening the debate on the role and the impact of the spermatozoa on the embryonic development and further later in life. Currently, this question is crucial and should be largely investigated with adequate controlled studies, as the early embryonic development is a very sensitive period, conducive to many epigenetic modifications, with potential early and late consequences on development. Finally, to answer the fundamental question of the parental contribution on the embryonic development could also lead to proposing preventive measures in the periconceptional period for both parents.

Contributorship Statement

CBr and PF were the principal investigators and take primary responsibility for the paper. CBr, FB contributed to collect the data. AB and CBi did the statistical analysis. CBr and FB drafted the manuscript. All authors gave their final approval of the version to be published.

Acknowledgments

We thank Suzanne Rankin for proofreading the manuscript.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE L'ARTICLE

Nos résultats obtenus avec les designs TL-DO et TL-DS confirment la participation importante de l'ovocyte sur les premiers stades de développement embryonnaire, mais ils mettent aussi en évidence un rôle possible du spermatozoïde dès le premier clivage.

A notre connaissance, il s'agit de la première étude rapportant une évaluation quantitative de la contribution parentale sur la cinétique précoce de l'embryon humain. Cette évaluation a été rendue possible en combinant deux designs originaux qui ont permis une évaluation indépendante des effets parentaux ainsi qu'une analyse statistique innovante basée sur une étude de la variance obtenue à partir de données morphocinétiques en système time-lapse (Embryoscope®).

La concordance remarquable entre les résultats de l'analyse de variance de TL-DO et TL-DS établit l'importance de la contribution féminine et valide par la même occasion le modèle utilisé pour cette étude. En effet, dans les deux designs, l'influence de la part maternelle semblent commencer dès l'expulsion du $2^{\text{ème}}$ globule polaire (tPB2) avec un effet sur les paramètres cinétiques de 10 à 30 fois supérieur à celui lié au père. Nous rapportons un ICC (coefficient de corrélation intraclasse) moyen pour l'effet maternel dans TL-DS correspondant à la moitié de la valeur retrouvée dans le design TL-DO (respectivement 20 et 40%). .Mais tandis que la comparaison entre effets maternels et paternels au sein d'un même design est possible, il faut rester prudent lors de la comparaison des ICC entre les 2 designs, d'autant que l'interprétation de l'ICC en soi demeure délicate compte tenu du manque d'études pour comparaison. Seule l'étude de Kirkegaard et *al* en 2016, qui analyse les facteurs confondants dans les différents temps de la cinétique sur plus de 1000 embryons, retrouve un ICC de 31% liée à l'origine même de l'embryon, et donc à la patiente dont il est issu (Kirkegaard *et al.*, 2016). Contrairement à la publication danoise, notre étude a l'avantage de ne pas se limiter à la quantification de l'effet maternel mais d'inclure également l'effet paternel, ouvrant la possibilité à d'autres études de variance dans le domaine.

Compte tenu de cette contribution maternelle majeure au début de la vie embryonnaire, nous avons évalué plusieurs facteurs maternels prépondérants, à savoir l'âge, l'IMC, le statut tabagique et le protocole de stimulation/type d'antagoniste. De façon surprenante, aucun effet intrinsèque féminin n'a clairement été identifié, ou uniquement de manière isolée.

Nos résultats retrouvent un impact de l'IMC de la donneuse sur le temps d'apparition des pronuclei (tPNa) (diff : +1.497h, IC95% [0.20 ; 2.79], *p=0.025*).Cet effet de l'IMC sur la cinétique a déjà été décrit dans la littérature (Bartolacci *et al.*, 2019; Bellver *et al.*, 2013). Néanmoins, nos chiffres sont à interpréter avec prudence puisque seules cinq de nos donneuses incluses (soit 16%) et six femmes dans TL-DS présentaient un IMC >30 kg/m². D'autre part, il s'agit d'un temps délicat à observer, donc sujet à de plus grandes variations.

Si nous avons rapporté une différence significative pour tPNa en relation avec l'IMC maternel dans TL-DO, elle n'a pas été observée dans le design TL-DS, pourtant conçu pour détecter l'implication du facteur féminin spécifiquement (et faisant à ce titre office de « contrôle » en quelque sorte). Grøndahl et *al* ne rapporte pas ce résultat dans leur étude prospective portant sur 42000 embryons malgré le fait qu'il observe une tendance à un premier clivage plus tardif avec l'âge maternel avancé (Grøndahl *et al.*, 2017). Ces observations concordent avec celles de Kirkegaard, qui ne font pas non plus ressortir de facteur maternel spécifique (Kirkegaard *et al.*, 2016).

L'âge maternel est considéré comme un facteur pronostic majeur en AMP, reflétant à la fois la quantité et la qualité des ovocytes (Igarashi *et al.*, 2015). En effet, les taux de grossesses et de naissances vivantes obtenus en AMP sont connus pour chuter considérablement avec l'augmentation de l'âge de la mère, surtout après 37 ans (Balasch, 2010). Dans notre travail, l'âge de la femme ne semble pas affecter la cinétique embryonnaire précoce : le résultat significatif observé pour tPB2 dans TL-DO ne montre pas une différence importante et n'est pas retrouvé pour les autres temps, ni dans le design spécifique TL-DS. En outre, le design TL-DO est basé sur une population contrôle d'ovocytes de donneuses de moins de 36 ans ; cet aspect pourrait limiter l'interprétation contrairement au design TL-DS, où les femmes incluses sont représentatives de la population générale. Ces résultats concordent avec des études récentes ne rapportant pas d'impact de l'âge maternel sur les paramètres morphocinétiques (Gryshchenko *et al.*, 2014; Watcharaseranee *et al.*, 2014). Ainsi, Warshaviak et son équipe ne montrent pas de différence cinétique entre les embryons issus de femmes de plus de 42 ans et ceux issus de femmes plus jeunes, après FIV (fécondation *in vitro*) conventionnelle (réduisant ainsi le facteur masculin); même s'ils ont observé une tendance à un arrêt de développement (Warshaviak *et al.*, 2019). Ces résultats soulèvent la question de la compétence ovocytaire, qui semble avoir plus d'influence que les facteurs intrinsèques comme l'âge ou l'IMC sur les premières étapes cinétiques. Cette compétence ovocytaire dépend de processus de maturation qui aboutissent notamment au stockage d'ARNm, et s'acquiert par le biais de transitions biologiques complexes débutant lors de la folliculogenèse (Conti et Franciosi, 2018). Les dérégulations de ces mécanismes de maturation cytoplasmique et nucléaire sont alors susceptibles de compromettre le potentiel de développement de l'embryon, mais en déterminer leurs origines précises reste encore ardu.

Dans la littérature, il est documenté depuis les années 90 que les deux premières divisions du zygote sont principalement contrôlés par les gènes maternels et que les gènes paternels commencent à s'exprimer après le stade 4 cellules, au moment de l'activation du génome embryonnaire (Braude *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 2014; Schier, 2007) A l'heure actuelle, le débat est ouvert pour savoir si le début du développement embryonnaire est exclusivement influencé par les facteurs maternels ou s'il existe déjà au stade précoce un effet paternel, comme propose l'équipe italienne de Tesarik (Tesarik et al., 2005).

Grâce à notre analyse statistique robuste, nous proposons pour la première fois une estimation du ratio de l'influence féminine et masculine sur les 48 premières heures de développement de l'embryon, et contrairement aux études précédentes rapportant un effet masculin uniquement à partir du stade 4 cellules, nous observons un effet paternel précoce dès le premier clivage, voir dès la disparition des pronuclei. Ces observations suggèrent que la cinétique de formation de l'embryon humain ne dépendrait pas uniquement du stock d'ARNm fournis par l'ovocyte. Malgré tout, cette influence paternelle semble relativement modérée, ce qui pourrait expliquer les divergences importantes dans les publications existantes quant au timing de développement et l'étendue des effets paternels sur la qualité embryonnaire (Beguería *et al.*, 2014; Colaci *et al.*, 2012; Colaco et Sakkas, 2018) .

De fait, les études précédemment publiées rapportent un impact des facteurs paternels non seulement sur le développement embryonnaire précoce mais également sur la formation du blastocyste, incluant des temps de clivage allongés, une morphologie embryonnaire altérée, des taux de blastulation et d'implantation plus faibles (Janny et Menezo, 1994; Parinaud *et al.*, 1993). Par exemple, Tesarik et son équipe ont étudié les effets potentiellement délétères sur le développement que pourraient provoquer les facteurs masculins : ils font l'hypothèse de l'existence d'un « effet paternel précoce » qui se manifesterait dès le stade zygote et expliquerait les retards dans les temps de clivage (Tesarik *et al*, 2005). Cet effet serait corrélé selon eux à des défauts touchant le contenu cytoplasmique des spermatozoïdes tels qu'un déficit en facteur d'activation ovocytaire ou des anomalies d'expression génique. Plus récemment, des équipes comme celle de Krawetz ou Ostermeier (Krawetz *et al.*, 2011) (Ostermeier *et al.*, 2004) ont mis en évidence la présence de transcrits paternels et de petits

ARN non codants spermatiques même avant l'activation du génome embryonnaire ; ces derniers pourraient avoir un rôle dans le développement embryonnaire précoce (Avendaño *et al.*, 2009; Jodar *et al.*, 2013).

De façon intéressante, nous faisons ressortir une tendance à une cinétique retardée chez les embryons issus de patients oligozoospermiques dans TL-DO dès le temps tPB2, avec plus de deux heures de différences avec les embryons issus de patients normozoospermiques pour les temps t3 et t4. En revanche, ces résultats ne se retrouvent pas dans le design TL-DS, probablement en raison du faible nombre de donneurs oligozoospermiques inclus dans ce design (n=3).

Durant la dernière décennie, plusieurs études témoignent de défauts de méthylation de l'ADN spermatique chez les hommes oligozoospermiques (Boissonnas *et al*., 2010; Hammoud *et al*., 2010; Houshdaran *et al*., 2007; Kobayashi *et al*., 2007; Laurentino *et al*., 2015; Marques *et al.*, 2008; Montjean *et al.*, 2013, 2015; Poplinski *et al*., 2010; Santi *et al*., 2017; Sato *et al.*, 2011) ainsi qu'une association entre oligozoospermie et défaut d'incorporation des protamines (Bowdin *et al*., 2007 ; Carrell and Hammoud, 2010 ; Marques *et al*., 2004, 2008). Une autre explication pour ces temps de clivage allongés en lien avec l'oligozoospermie pourrait découler de la mise en place de mécanismes de réparation de l'ADN au début du développement de l'embryon ; suite à la fécondation a lieu une reprogrammation épigénétique et une réorganisation des noyaux, au cours duquel le génome paternel subit là encore de profonds changements, les protamines sont remplacées par des histones maternelles (Rodman *et al*., 1981) et s'accompagne d'une déméthylation active de l'ADN. Cet état « déméthylé » perdure jusqu'à l'activation du génome embryonnaire, moment où de nouvelles marques épigénétiques sont apposées. Le rôle exact de ces remaniements chromatiniens sur le développement embryonnaire est encore peu connu, mais il a été rapporté que des altérations de compaction de la chromatine, du ratio de protamines ou de la fragmentation de l'ADN spermatique pourraient être responsables d'une diminution du taux de fécondation, d'un retard dans les premiers clivages et d'une morphologie embryonnaire dégradée (Colaco and Sakkas, 2018; Seli *et al.*, 2004; Simon *et al.*, 2014) bien que ces données restent encore controversées (Aston *et al.*, 2015).

L'intérêt principal de notre étude réside dans la méthodologie utilisée avec une population de donneurs et donneuses, se rapprochant d'un groupe « contrôle » pour évaluer indépendamment la contribution parentale sur la cinétique de développement précoce de l'embryon humain. Néanmoins, cette évaluation innovante restreint la taille de notre population puisque les donneurs/donneuses constituent le principal facteur limitant, d'autant plus que leur inclusion se limite dans notre étude à ceux dont les gamètes ont été attribués à aux moins deux couples receveurs différents. De plus, les données cinétiques à notre disposition nous imposaient de restreindre l'évaluation aux 48 premières heures du développement embryonnaire, empêchant l'évaluation au stade plus tardif de blastocyste, et donc après l'activation du génome embryonnaire. Au regard de la littérature, il aurait également été intéressant d'évaluer la chromatine spermatique, tout comme la méthylation et la fragmentation de l'ADN spermatique afin de juger de leur implication potentielle. Mais si la perspective d'élargir les analyses est intéressante, elle implique d'intégrer de nouveaux facteurs confondants potentiels dans l'analyse multivariée et, de ce fait, pourrait fortement diminuer la puissance de l'étude. C'est pourquoi la perspective d'associer un modèle prospectif à une méthodologie similaire, incluant des facteurs féminins et masculins variés, pourrait être un choix pertinent afin d'obtenir des résultats solides dans le domaine.

Le dogme largement basé sur des études génétiques empiriques, selon lequel le développement embryonnaire précoce est conditionné par la contribution maternelle, semble de plus en plus contesté ; ouvrant la porte aux débats sur le rôle et l'impact du spermatozoïde sur les premiers stades de développement de l'embryon humain. Cette question cruciale nécessite par la suite des études contrôlées adéquates, au vu de l'importance que revêt la période de développement embryonnaire précoce. Sujette à une reprogrammation épigénétique majeure, cette période sensible peut avoir des répercussions potentielles jusqu'à l'âge adulte. Ainsi, répondre à cette interrogation fondamentale sur la contribution parentale au développement de l'embryon pourrait également amener à des mesures préventives à proposer aux parents en période périconceptionelle.

Université de Bourgogne

UFR des Sciences de Santé

Circonscription Médecine

THESE SOUTENUE PAR Mme BARRY Fatima

CONCLUSIONS

Cette étude basée sur un modèle original, mené en collaboration avec l'équipe du Pr Christine Binquet, a permis de quantifier l'effet des caractéristiques féminines et masculines sur le développement embryonnaire préimplantatoire à l'aide d'un système time lapse. Ces résultats confirment l'importance de la contribution maternelle, toutefois ils suggèrent un rôle non négligeable du facteur paternel puisque les embryons issus de patients oligozoospermiques présenteraient une cinétique de développement plus lente, et ce, dès l'effacement des pronuclei. D'autres effets sous-jacents sur le développement embryonnaire précoce liés aux facteurs génétiques et épigénétiques méritent de faire l'objet de recherches supplémentaires. Travail qui fera l'objet d'un article pour une soumission dans une revue internationale.

Le Président du jury,

Pr. Patricia Fauque

Vu et permis d'imprimer
Dijon, le 11 Septembre 2020
Le Doyen

Pr. M. MAYNADIÉ

Bibliographie

Akhter N, Shahab M. Morphokinetic analysis of human embryo development and its relationship to the female age: a retrospective time-lapse imaging study. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2017;**63**:84–92.

Aston KI, Uren PJ, Jenkins TG, Horsager A, Cairns BR, Smith AD, Carrell DT. Aberrant sperm DNA methylation predicts male fertility status and embryo quality. *Fertil Steril* 2015;**104**:1388-1397.e1–5.

Auger J, Eustache F, David G. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie* 2000;**10**:358–373.

Avendaño C, Franchi A, Jones E, Oehninger S. Pregnancy-specific {beta}-1-glycoprotein 1 and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm: differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development. *Hum Reprod* 2009;**24**:270–277.

Balasch J. Ageing and infertility: an overview. *Gynecol Endocrinol* 2010;**26**:855–860.

Barberet J, Bruno C, Valot E, Antunes-Nunes C, Jonval L, Chammas J, Choux C, Ginod P, Sagot P, Soudry-Faure A, *et al.* Can novel early non-invasive biomarkers of embryo quality be identified with time-lapse imaging to predict live birth? *Hum Reprod* 2019;**34**:1439–1449.

Barberet J, Chammas J, Bruno C, Valot E, Vuillemin C, Jonval L, Choux C, Sagot P, Soudry A, Fauque P. Randomized controlled trial comparing embryo culture in two incubator systems: G185 K-System versus EmbryoScope. *Fertility and Sterility* 2018;**109**:302-309.e1.

Bartolacci A, Buratini J, Moutier C, Guglielmo MC, Novara PV, Brambillasca F, Renzini MM, Dal Canto M. Maternal body mass index affects embryo morphokinetics: a time-lapse study. *J Assist Reprod Genet* 2019;**36**:1109–1116.

Beguería R, García D, Obradors A, Poisot F, Vassena R, Vernaeve V. Paternal age and assisted reproductive outcomes in ICSI donor oocytes: is there an effect of older fathers? *Hum Reprod* 2014;**29**:2114–2122.

Bellver J, Mifsud A, Grau N, Privitera L, Meseguer M. Similar morphokinetic patterns in embryos derived from obese and normoweight infertile women: a time-lapse study. *Hum Reprod* 2013;**28**:794–800.

Bliese PD. Group Size, ICC Values, and Group-Level Correlations: A Simulation. *Organizational Research Methods* 1998;**1**:355–373.

Bodri D, Sugimoto T, Serna JY, Kondo M, Kato R, Kawachiya S, Matsumoto T. Influence of different oocyte insemination techniques on early and late morphokinetic parameters: retrospective analysis of 500 time-lapse monitored blastocysts. *Fertil Steril* 2015;**104**:1175-1181.e1–2.

Boissonnas CC, Abdalaoui HE, Haelewyn V, Fauque P, Dupont JM, Gut I, Vaiman D, Jouannet P, Tost J, Jammes H. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet* 2010;**18**:73–80.

Bowdin S, Allen C, Kirby G, Brueton L, Afnan M, Barratt C, Kirkman-Brown J, Harrison R, Maher ER, Reardon W. A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders. *Hum Reprod* 2007;**22**:3237–3240.

Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988;**332**:459–461.

Buran A, Tulay P, Dayıoğlu 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* 2019;**51**:e13217.

Carrell DT, Hammoud SS. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**:37–47.

Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media--a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet* 2012;**29**:891–900.

Colaci DS, Afeiche M, Gaskins AJ, Wright DL, Toth TL, Tanrikut C, Hauser R, Chavarro JE. Men's body mass index in relation to embryo quality and clinical outcomes in couples undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2012;**98**:1193-1199.e1.

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

Conti M, Franciosi F. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. *Hum Reprod Update* 2018;**24**:245–266.

Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, *et al.* World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010;**16**:231–245.

Cruz M, Garrido N, Gadea B, Muñoz M, Pérez-Cano I, Meseguer M. Oocyte insemination techniques are related to alterations of embryo developmental timing in an oocyte donation model. *Reprod Biomed Online* 2013;**27**:367–375.

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* 2018;**35**:1339–1348.

Desch L, Bruno C, Luu M, Barberet J, Choux C, Lamotte M, Schmutz E, Sagot P, Fauque P. Embryo multinucleation at the two-cell stage is an independent predictor of intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil Steril* 2017;**107**:97-103.e4.

Esbert M, Pacheco A, Soares SR, Amorós D, Florensa M, Ballesteros A, Meseguer M. High sperm DNA fragmentation delays human embryo kinetics when oocytes from young and healthy donors are microinjected. *Andrology* 2018;**6**:697–706.

Faramarzi A, Khalili MA, Mangoli E. Correlations between embryo morphokinetic development and maternal age: Results from an intracytoplasmic sperm injection program. *Clin Exp Reprod Med* 2019;**46**:119–124.

Goldstein H. Multilevel covariance component models. *Biometrika* 1987;**74**:430–431.

Grøndahl ML, Christiansen SL, Kesmodel US, Agerholm IE, Lemmen JG, Lundstrøm P, Bogstad J, Raaschou-Jensen M, Ladelund S. Effect of women's age on embryo morphology, cleavage rate and competence-A multicenter cohort study. *PLoS ONE* 2017;**12**:e0172456.

Gryshchenko MG, Pravdyuk AI, Parashchyuk VY. Analysis of factors influencing morphokinetic characteristics of embryos in ART cycles. *Gynecol Endocrinol* 2014;**30 Suppl 1**:6–8.

Gurbuz AS, Gode F, Uzman MS, Ince B, Kaya M, Ozcimen N, Ozcimen EE, Acar A. GnRH agonist triggering affects the kinetics of embryo development: a comparative study. *J Ovarian Res* 2016;**9**:22.

Hammoud SS, Purwar J, Pflueger C, Cairns BR, Carrell DT. Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertil Steril* 2010;**94**:1728–1733.

Houshdaran S, Cortessis VK, Siegmund K, Yang A, Laird PW, Sokol RZ. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS ONE* 2007;**2**:e1289.

Igarashi H, Takahashi T, Nagase S. Oocyte aging underlies female reproductive aging: biological mechanisms and therapeutic strategies. *Reprod Med Biol* 2015;**14**:159–169.

Janny L, Menezo YJ. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 1994;**38**:36–42.

Jiang J. *Linear and Generalized Linear Mixed Models and Their Applications*. Springer-Verlag New York, 2007.

Jodar M, Selvaraju S, Sendler E, Diamond MP, Krawetz SA, Reproductive Medicine Network. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Hum Reprod Update* 2013;**19**:604–624.

Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil Steril* 2013;**99**:738-744.e4.

Kirkegaard K, Sundvall L, Erlandsen M, Hindkjær JJ, Knudsen UB, Ingerslev HJ. Timing of human preimplantation embryonic development is confounded by embryo origin. *Hum Reprod* 2016;**31**:324–331.

Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, Sasaki H, Yaegashi N, Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet* 2007;**16**:2542–2551.

Krawetz SA, Kruger A, Lalancette C, Tagett R, Anton E, Draghici S, Diamond MP. A survey of small RNAs in human sperm. *Hum Reprod* 2011;**26**:3401–3412.

Laurentino S, Beygo J, Nordhoff V, Kliesch S, Wistuba J, Borgmann J, Buiting K, Horsthemke B, Gromoll J. Epigenetic germline mosaicism in infertile men. *Hum Mol Genet* 2015;**24**:1295–1304.

Leary C, Leese HJ, Sturmey RG. Human embryos from overweight and obese women display phenotypic and metabolic abnormalities. *Hum Reprod* 2015;**30**:122–132.

Lee MT, Bonneau AR, Giraldez AJ. Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014;**30**:581–613.

Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 2004;**363**:1700–1702.

Marques CJ, Costa P, Vaz B, Carvalho F, Fernandes S, Barros A, Sousa M. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2008;**14**:67–74.

Montjean D, Ravel C, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie P, Berthaut I, Bashamboo A, McElreavey K. Methylation changes in mature sperm deoxyribonucleic acid from oligozoospermic men: assessment of genetic variants and assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2013;**100**:1241–1247.

Montjean D, Zini A, Ravel C, Belloc S, Dalleac A, Copin H, Boyer P, McElreavey K, Benkhalifa M. Sperm global DNA methylation level: association with semen parameters and genome integrity. *Andrology* 2015;**3**:235–240.

Muñoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Pérez-Cano I, Meseguer M. The type of GnRH analogue used during controlled ovarian stimulation influences early embryo developmental kinetics: a time-lapse study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;**168**:167–172.

Nikolova S, Parvanov D, Georgieva V, Ivanova I, Ganeva R, Stamenov G. Impact of sperm characteristics on time-lapse embryo morphokinetic parameters and clinical outcome of conventional in vitro fertilization. *Andrology* 2020.

Oehlert GW. A Note on the Delta Method. *The American Statistician* 1992;**46**:27–29.

Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 2004;**429**:154.

Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G, Labal B, Richoilley G. Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril* 1993;**60**:888–892.

Poplinski A, Tüttelmann F, Kanber D, Horsthemke B, Gromoll J. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. *Int J Androl* 2010;**33**:642–649.

Rodman TC, Pruslin FH, Hoffmann HP, Allfrey VG. Turnover of basic chromosomal proteins in fertilized eggs: a cytoimmunochemical study of events in vivo. *J Cell Biol* 1981;**90**:351–361.

Sacha CR, Dimitriadis I, Christou G, James K, Brock ML, Rice ST, Bhowmick P, Bormann CL, Souter I. The impact of male factor infertility on early and late morphokinetic parameters: a retrospective analysis of 4126 time-lapse monitored embryos. *Hum Reprod* 2020;**35**:24–31.

Sagi-Dain L, Sagi S, Dirnfeld M. Effect of paternal age on reproductive outcomes in oocyte donation model: a systematic review. *Fertil Steril* 2015;**104**:857-865.e1.

Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998;**13**:182–187.

Santi D, De Vincentis S, Magnani E, Spaggiari G. Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: a meta-analytic study. *Andrology* 2017;**5**:695–703.

Sato A, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Abe Y, Utsunomiya T, Yaegashi N, Arima T. Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation polymerase chain reaction Luminex analysis. *Fertil Steril* 2011;**95**:129–134, 134.e1–4.

Scarselli F, Casciani V, Cursio E, Muzzì S, Colasante A, Gatti S, Greco MC, Greco P, Minasi MG, Greco E. Influence of human sperm origin, testicular or ejaculated, on embryo morphokinetic development. *Andrologia* 2018;**50**:e13061.

Schier AF. The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science* 2007;**316**:406–407.

Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004;**82**:378–383.

Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, Hotaling J, Carrell DT. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod* 2014;**29**:2402–2412.

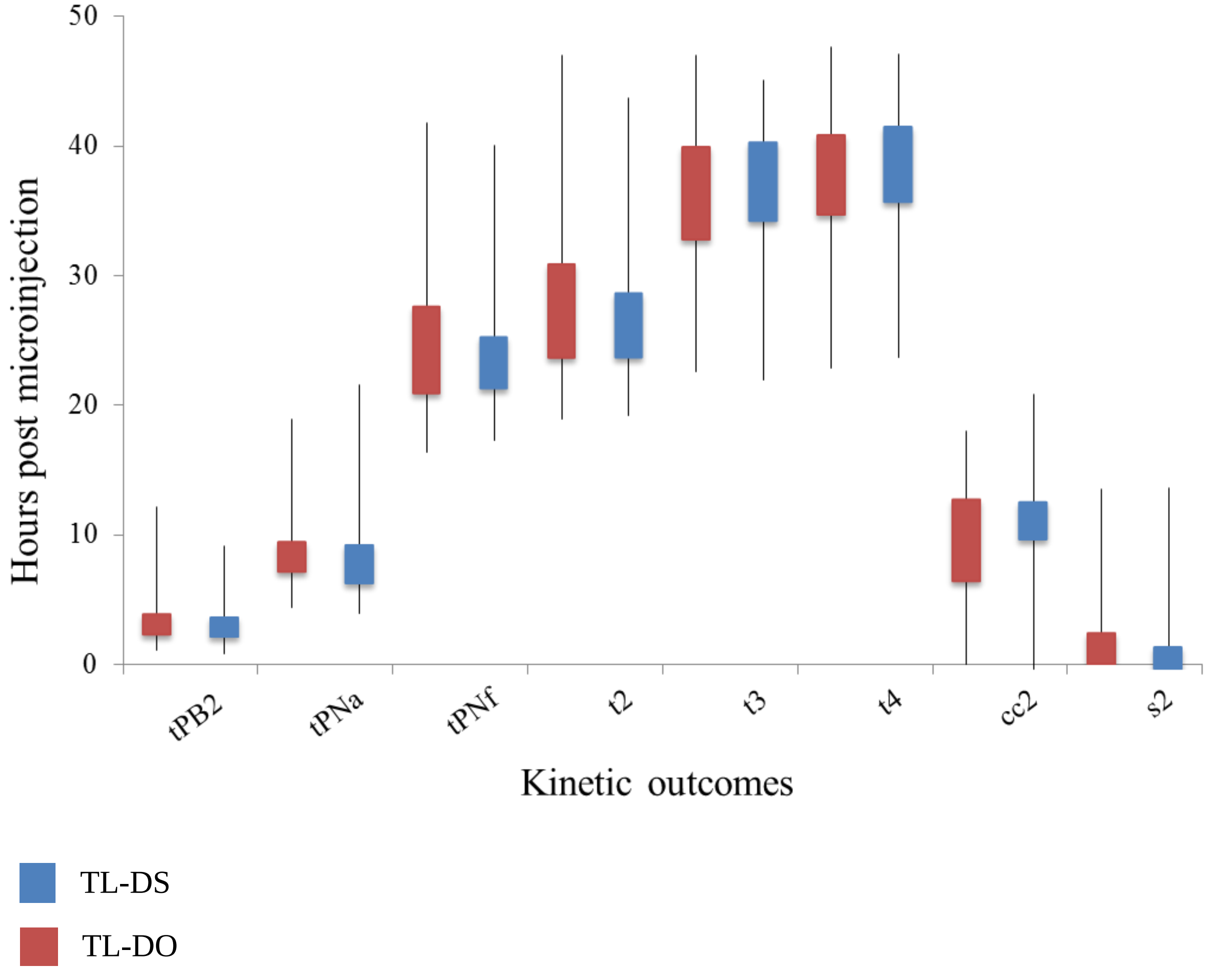
Tesarik J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod Biomed Online* 2005;**10**:370–375.

Verbeke G, Molenberghs G. *Linear Mixed Models for Longitudinal Data*. Springer Science & Business Media, 2009.

Warshaviak M, Kalma Y, Carmon A, Samara N, Dviri M, Azem F, Ben-Yosef D. The Effect of Advanced Maternal Age on Embryo Morphokinetics. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;**10**:686.

Watcharaseranee N, Ploskonka SD, Goldberg J, Falcone T, Desai N. Does advancing maternal age affect morphokinetic parameters during embryo development? *Fertility and Sterility* 2014;**102**:e213–e214.

Annexes



Suppl Figure 1 Embryo kinetic outcomes in TL-DO and TL-DS
Kinetic outcomes are expressed in hours, starting from t0 (time of microinjection)
Boxes represent interquartile range (Q1-Q3), bars represent minimum and maximum

Université de Bourgogne

UFR des Sciences de Santé

Circonscription Médecine

TITRE DE LA THESE :

ANALYSE ET QUANTIFICATION DES CONTRIBUTIONS MATERNELLES ET PATERNELLES AUX PREMIERES ETAPES DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE : ETUDE EN SYSTEME TIME-LAPSE

ANALYSIS AND QUANTIFICATION OF FEMALE AND MALE CONTRIBUTIONS TO THE FIRST STAGES OF EMBRYONIC DEVELOPMENT: STUDY FROM A TIME LAPSE SYSTEM

AUTEUR : BARRY FATIMA

RESUME : Il est admis que le bon déroulement du développement embryonnaire précoce est conditionné par la qualité ovocytaire ; cependant, les résultats rapportés restent hétérogènes quant au rôle de la part masculine. Dans le but de déterminer la contribution propre des facteurs féminins et masculins sur la cinétique de développement embryonnaire précoce, nous avons entrepris une étude originale en deux designs, reposant sur des embryons issus d'ovocytes de donneuses (**TL-DO**) et de sperme de donneurs (**TL-DS**).

Notre étude rétrospective a permis d'inclure un total de 572 ovocytes microinjectés incubés dans un système time lapse au CHU de Dijon de mars 2013 à avril 2019, soit 402 embryons. Les critères de jugement correspondaient aux temps suivants en heures : apparition et disparition des pronuclei (respectivement tPNa et tPNf), les temps de clivages t2, t3, t4, les périodes cc2 (t3-t2) et s2 (t4-t3). Nous avons pu observer que la variabilité de l'ensemble des temps des temps de développement étudiés était significativement attribuable à la part féminine. Comparativement, les effets de la variance attribuée à la part masculine étaient faibles, exceptés pour les temps t3 et cc2 dans TL-DO. En analyse multivariée, le temps tPNa était significativement augmenté chez les femmes avec un IMC $\geq$ 30 kg/m² et l'oligozoospermie avait tendance à être associée à des temps plus longs.

Nos résultats quantifient pour la première fois l'importance de la contribution maternelle sur le développement embryonnaire précoce, toutefois ils suggèrent un rôle non négligeable du facteur paternel. Des effets liés aux facteurs génétiques et épigénétiques pourraient faire l'objet d'autres recherches.

MOTS-CLES : DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE / TIME LAPSE/ FACTEUR PATERNEL / FACTEUR MATERNEL / MORPHOCINETIQUE