

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : Biologie Cellulaire, Biologie du Développement

Par

**Arnaud REIGNIER**

**Analyses du développement embryonnaire humain pré-implantatoire :  
comprendre pour mieux choisir**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 07/12/2020

Unité de recherche : Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et immunologie, Unité mixte de  
recherche 1064, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie

## Rapporteurs avant soutenance :

Sophie BROUILLET    Maître de conférences des universités-praticien hospitalier, INSERM U1203  
Fabrice GUERIF    Professeur des universités, UMR Université-CNRS INRA 7247

## Composition du Jury :

Président :    Paul BARRIERE    Professeur des universités, CRTI UMR 1064  
Examineurs : Sophie BROUILLET    Maître de conférences des universités-praticien hospitalier, INSERM U1203  
                         Fabrice GUERIF    Professeur des universités, UMR Université-CNRS INRA 7247  
Dir. de thèse : Thomas FREOUR    Professeur des universités, CRTI UMR 1064

## Invité(s)

Djemil BENCHARIF    Maître de conférences des universités, Oniris  
Antoine ROQUILLY    Professeur des universités, Laboratoire de Thérapeutique Expérimentale et Clinique des  
Infections



## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	3
<b>Liste des abréviations</b> .....	9
<b>Introduction Générale</b> .....	11
<b>A] Etat des lieux des résultats en AMP</b> .....	11
<b>B] Etat des lieux des connaissances sur le développement pré-implantatoire humain</b> .....	14
<b>C] Paramètres actuellement utilisés dans l'évaluation de la qualité embryonnaire :</b> <b>description et limites</b> .....	17
<b>I - Morphologie embryonnaire</b> .....	17
<b>II - Le PGT-A</b> .....	24
<b>III - Le Time Lapse</b> .....	26
<b>Article 1</b> .....	27
<b>Problématique</b> .....	37
<b>Projet</b> .....	38
<b>A] Evaluation des modèles prédictifs</b> .....	41
<b>Article 2</b> .....	41
<b>B] Etude de l'association entre paramètres morphocinétiques et ploïdie embryonnaire</b> .....	52
<b>Article 3</b> .....	53
<b>Article 4</b> .....	64
<b>C] Annotation automatisée des paramètres morphocinétiques</b> .....	73
<b>Article 5</b> .....	74
<b>D] Synthèse des principaux résultats obtenus</b> .....	83
<b>Discussion</b> .....	84
<b>Conclusion</b> .....	92
<b>References</b> .....	93



## **Table des figures**

<b>Figure 1 : Schéma du développement humain pré-implantatoire et de la spécification cellulaire. Meistermann et al , en révision .....</b>	<b>16</b>
<b>Figure 2 : Classification embryonnaire précoce selon le consensus d'Istanbul .....</b>	<b>18</b>
<b>Figure 3 : Classification de Gardner et Schoolcraft.....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 4: Evaluation du caractère prédictif de plusieurs modèles publiés dans la littérature.....</b>	<b>38</b>
<b>Figure 5: Figure 5 : Résumé graphique de la thèse et publications associées.....</b>	<b>40</b>



## Liste des abbréviations

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

ARN : Acide Ribonucléique

AUC : Aire sous la courbe

CNN : Réseau neuronal convolutif

CGH : Hybridation génomique comparative

DPI : Diagnostic Pré-Implantatoire

DPI-A : Diagnostic Pré-Implantatoire d'aneuploïdie

ESHRE : European Society of Human Reproduction and Embryology

FISH : Hybridation in situ en fluorescence

FIV : Fécondation In Vitro

IA : Intelligence artificielle

ICC : Coefficient de corrélation inter classe

ICSI : Intra Cytoplasmic Sperm Injection

MCI : Masse Cellulaire Interne

NGS : Séquençage de nouvelle génération

qPCR : Réaction en chaîne par polymérase quantitative

TE : Trophoblaste





## Introduction Générale

### **A] Etat des lieux des résultats en AMP**

Depuis la naissance de Louise Brown en 1978, le recours aux techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) s'est démocratisé et concerne un nombre croissant de couples en désir de parentalité.

Selon l'INSEE, il y a eu 769 553 naissances vivantes en France en 2017(1). Parmi ces naissances, 25 614 étaient issues d'une prise en charge en AMP, soit 3,3% des enfants nés de la population générale (2).

Le nombre d'enfants conçus par AMP parmi les enfants nés chaque année en France augmente légèrement depuis 2009 (2,6% en 2009, 3,3% en 2017).

Cette augmentation du recours aux techniques d'AMP s'observe également à l'échelle européenne avec un passage de 35 314 enfants nés après AMP en 1997 à 187 542 en 2015, soit un total de 1,6 million depuis les débuts de l'AMP en Europe (3) et environ 541 636 cycles réalisés au sein des 38 pays européens faisant partie de l'European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE).

Le dernier rapport étudiant les résultats mondiaux relate la même dynamique avec environ 1 948 898 cycles d'AMP observés (Chine non incluse) en 2012 (4), soit une augmentation de 18,4% par rapport à l'année précédente. et la naissance de plus de 465 286 la même année.

L'AMP est un ensemble de techniques médicales encadrées par la Loi n°2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique, révisée le 7 juillet 2011 (2011-814) et en cours de révision en 2020 dont les dispositions ont été incluses dans le Code de la Santé Publique. Elle s'entend des pratiques cliniques et biologiques permettant la "Fécondation in vitro (FIV)", le transfert d'embryons et l'insémination artificielle, ainsi que toute technique d'effet équivalent permettant la procréation en dehors du processus naturel. Ainsi parmi ces techniques la Fécondation In Vitro (FIV) et la Fécondation In Vitro avec micro-injection (ICSI) représentaient respectivement 15.4% et 32.5% des naissances vivantes après AMP en 2017. Au total, le taux de

naissance vivante par ponction ovocytaire était en moyenne de 19,3% en Europe en 2015 (3) et de 20,2 % en France en 2017 (2) .

Une FIV se déroule actuellement selon le schéma suivant : 5 à 20 ovocytes sont en moyenne recueillis par ponction ovarienne chez une patiente après stimulation ovarienne contrôlée puis sont mis en contact avec les spermatozoïdes pour procéder à la fécondation proprement dite. Cette mise en fécondation nécessite une étape initiale de préparation des spermatozoïdes permettant leur capacitation. Un nombre supra-physiologique de spermatozoïdes capacités est ensuite déposé directement au contact des complexes cumulo-ovocytaires ponctionnés en cas de FIV classique ; ou les spermatozoïdes capacités sont sélectionnés individuellement et injectés directement dans chaque ovocyte mature. Les zygotes résultant de cette fécondation sont ensuite mis en culture jusqu'au troisième ou cinquième jour (blastocyste) avant un éventuel transfert intra-utérin.

Le transfert de plusieurs embryons, souvent à un stade précoce (J2 ou J3) mais aussi parfois le transfert de plusieurs blastocystes, a longtemps été la stratégie de transfert embryonnaire la plus courante dans les centres d'AMP. Cette stratégie offre la possibilité d'obtenir des taux de naissance vivante par transfert suffisants mais est entachée par une fréquence importante des grossesses multiples et des complications obstétricales associées. Ainsi en 2015, l'incidence des naissances avec très grande prématurité (20–27 semaines de grossesse) était de 1,3% dans les grossesses avec singleton, 3,7% pour les grossesses gémellaires et 13,4% pour les grossesses triples. De même, l'incidence des naissances avec grande prématurité (28–32 semaines de grossesse) était de 9,9% pour les grossesses de jumeaux et de 39,2% pour les triplés (3). Avec l'amélioration des conditions de culture au laboratoire, la possibilité de culture prolongée jusqu'au stade blastocyste et surtout l'avènement de la vitrification embryonnaire, il a été observé un changement dans cette stratégie de transfert embryonnaire au début des années 2000. En effet, afin d'offrir les meilleures chances de succès pour les patients et tout en limitant les risques obstétricaux liés à la grossesse multiple, il est recommandé de privilégier le transfert d'embryon unique (5) et de vitrifier les autres embryons dans le but de réaliser un transfert d'embryon congelé en cas d'absence de grossesse (6). Cette stratégie est largement employée et certaines équipes ont démontré la plus-value d'un nombre relativement important d'ovocytes ponctionnés dans le but d'obtenir

plusieurs blastocystes utilisables et d'augmenter les chances cumulées de naissance vivante à partir d'une seule ponction (7,8). L'excellente performance de la vitrification embryonnaire a conduit d'autres équipes à recommander la congélation systématique de tous les embryons utilisables dans le but de limiter l'impact délétère de la stimulation ovarienne sur l'endomètre, augmentant ainsi les chances de grossesse. Cependant aucun consensus sur la stratégie de congélation totale n'existe à ce jour (9,10). Des recommandations internationales sur le nombre d'embryons à transférer existent. Ainsi l'American Society for Reproductive Medicine recommande systématiquement le transfert d'un seul embryon pour les patientes de moins de 38 ans (11). De même, la législation belge a très strictement encadré le nombre maximum d'embryons transférables en fonction de l'âge féminin et du rang du cycle d'AMP concerné. Le transfert d'un embryon unique est alors systématiquement proposé aux femmes de moins de 36 ans lors de leur premier cycle alors qu'aucune limite existe pour les femmes de plus de 42 ans (12) Les centres d'AMP français semblent suivre ces recommandations puisqu'il est observé une diminution de la proportion de transferts multiples lors du transfert frais (60% en 2012 et 49,4% en 2017) et une priorisation du transfert d'embryon unique (50,6% des transferts en 2017) (2). Le transfert d'embryon unique représente même 72,5% des transferts d'embryons congelés en 2017 (2). Le but final de cette stratégie de transfert d'embryon unique est l'obtention de la grossesse le plus rapidement possible, limitant ainsi le nombre de cycles nécessaires à son obtention et donc les risques d'épuisement moral des couples et les abandons de prise en charge associés(13). Il devient alors primordial de pouvoir identifier l'embryon avec le potentiel implantatoire de la façon la plus optimale possible et de maîtriser au maximum nos connaissances sur le développement embryonnaire humain péri-implantatoire.

## **B] Etat des lieux des connaissances sur le développement pré-implantatoire humain**

La compréhension du développement embryonnaire pré-implantatoire humain est primordiale pour améliorer les résultats de l'AMP et établir des pistes pour réduire l'infertilité. La majorité des études portant sur l'embryon humain ont été réalisées à partir d'embryons créés in vitro et donnés à la recherche ou par la mise en fécondation in vitro de gamètes donnés à la recherche. Interdite en France dans les premières lois bioéthiques de 1994, la recherche sur l'embryon a fait depuis l'objet d'évolutions juridiques importantes : elle est passée d'un régime d'interdiction avec dérogations à partir de 2004, à un régime d'autorisation encadré en 2013. Aujourd'hui, les chercheurs autorisés peuvent travailler à partir d'embryons ne faisant plus l'objet d'un projet parental, conçus dans le cadre d'une fécondation in vitro ou d'un diagnostic préimplantatoire que les parents choisissent de donner à la recherche. Ces travaux de recherche sont strictement encadrés par l'Agence de la biomédecine qui s'assure à chaque étape de leur conformité avec le cadre légal et les règles éthiques. La loi de bioéthique interdit la création d'embryons pour la recherche ou d'embryons transgéniques ou chimériques.

Dans l'espèce humaine, comme chez les autres mammifères, la première étape consiste en la fusion de l'ovocyte et du spermatozoïde, à l'origine de la cellule diploïde appelée zygote. La fécondation a ainsi lieu dans les trompes de Fallope après que le spermatozoïde a pénétré les cellules du cumulus entourant l'ovocyte et se soit fixé à la zone pellucide. Cette fixation induit la réaction acrosomique au niveau du spermatozoïde et il va pouvoir se fixer à la membrane cytoplasmique ovocytaire et voir son contenu internalisé. Cela déclenche la réaction ovocytaire et la réinitialisation du cycle cellulaire avec ségrégation des chromosomes et extrusion du deuxième globule polaire, l'ovocyte étant bloqué en métaphase de la deuxième division méiotique. Le fuseau mitotique se met ensuite en place, les pronuclei disparaissent et la première division mitotique survient. Le rapport nucléocytoplasmique augmente alors à chaque division mitotique, le volume de l'embryon restant identique. La transcription embryonnaire reste silencieuse jusqu'au stade 8 cellules (3<sup>ème</sup> jour de développement) et le métabolisme ne dépend alors que de la traduction des ARN messagers maternels et des protéines présentes dans le cytoplasme de l'ovocyte initialement. Finalement l'activation du génome

embryonnaire ne débute que vers 2,5 jours de développement. La suite des évènements est marquée par un phénomène de compaction en parallèle de la poursuite des divisions mitotiques, les cellules adhérant fortement entre elles et formant ainsi le stade morula. On retrouve alors au niveau de ces cellules, la présence de jonctions serrées (protéine ZO-1 occludines et claudines) (14). Les jonctions adhérentes et dépendantes du calcium mettent quant à elles en jeu la E-cadherine et des caténines (15). Les mécanismes impliqués dans le déclenchement de cette compaction sont à ce jour peu compris. Alors qu'à ce stade, la polarisation des cellules au sein de la morula semble définir leur destin cellulaire futur chez la souris, de tels mécanismes n'ont pas été montrés dans l'espèce humaine. Le début de la cavitation survient peu de temps après la compaction totale de la morula et est à l'origine du stade blastocyste défini par la présence d'une cavité appelée blastocœle et d'une masse cellulaire interne (MCI) entourées par des cellules du trophoblaste (TE) au 5<sup>ème</sup> jour de développement. La ségrégation entre la MCI et le TE marque la première spécification de lignée cellulaire dans le développement embryonnaire. Entre le 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> jour, la MCI est le lieu d'une nouvelle spécification cellulaire avec apparition de l'épiblaste pluripotent, à l'origine du futur fœtus, et de l'endoderme primitif. Ces différentes vagues de spécification de lignée cellulaire sont à ce jour encore peu définies dans l'espèce humaine et de nombreux travaux sont en cours dans ce sens. Cette question entre dans la thématique de notre équipe de recherche et Meistermann et al (16) utilisent les données de transcriptomique de cellules uniques d'embryons humains et la provenance spatiotemporelle de ces cellules pour définir les signatures transcriptomiques spécifiques de cette spécification cellulaire et les voies métaboliques potentiellement impliquées.

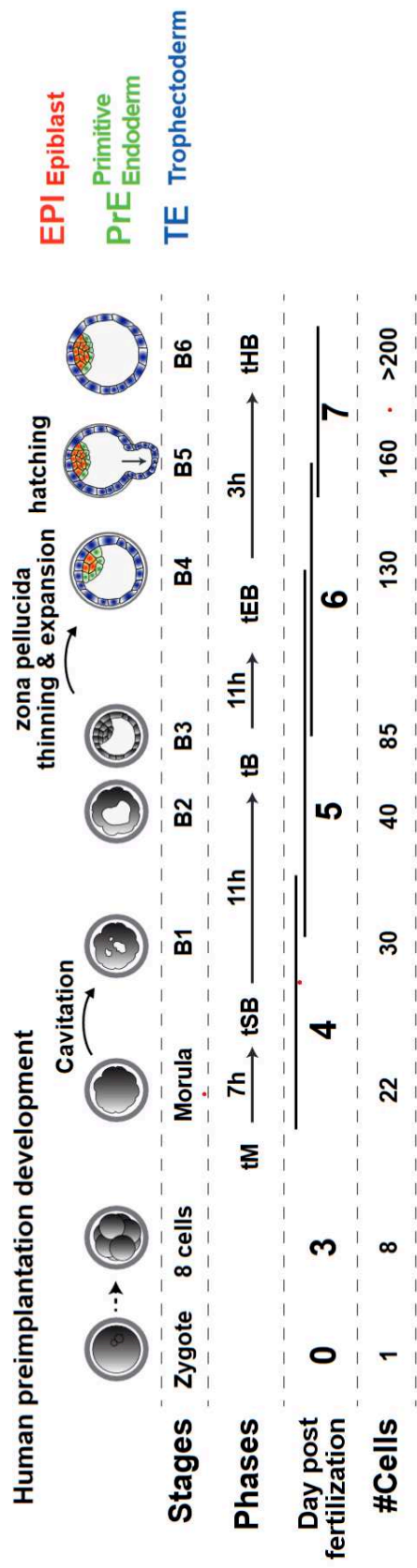


Figure 1 : Schéma du développement humain pré-implantatoire et de la spécification cellulaire. Meistermann et al , en révision

En parallèle, le blastocyste poursuit son expansion, la zone pellucide s'amincissant avant de rompre et de permettre au blastocyste d'éclore complètement et de pénétrer dans la paroi de l'endomètre vers le 7<sup>ème</sup> jour post fécondation. Cette implantation doit survenir après modification de la structure endométriale, sous influence de la progestérone et correspondant à la fenêtre implantatoire. L'implantation semble faire intervenir une interaction bidirectionnelle entre le blastocyste et l'endomètre mettant en jeu des molécules telles que les intégrines, les mucines... L'implantation humaine ne pouvant être observée in vivo, les connaissances actuelles sont basées sur les descriptions histologiques de Carnegie dans les années 1950 et des extrapolations des modèles animaux. Cependant les techniques récentes de culture embryonnaire prolongée au-delà du 7<sup>ème</sup> jour de développement (17,18) et le recours aux modèles organoïdes ouvrent la voie à l'étude en temps réel des mécanismes impliqués (19).

## **C] Paramètres actuellement utilisés dans l'évaluation de la qualité embryonnaire : description et limites**

En dépit d'une difficulté à maîtriser l'ensemble des paramètres maternels relatifs à l'implantation embryonnaire, le choix du ou des embryon(s) à sélectionner pour le transfert intra-utérin est un critère primordial pour la réussite de la tentative d'AMP. Actuellement le seul paramètre sélectif unanimement reconnu est l'évaluation morphologique embryonnaire quotidienne à laquelle s'ajoutent de nouvelles approches décrites ci-dessous

### **I - Morphologie embryonnaire**

L'amélioration des conditions de culture embryonnaire dans les laboratoires de FIV, ajoutée à la maîtrise de la stimulation hormonale ovarienne, a permis l'obtention de plusieurs embryons potentiellement viables à partir d'une même cohorte d'ovocytes ponctionnés. Dans un but d'optimisation de la prise-en-charge des couples suivis en AMP, il a été important de mettre en évidence des paramètres prédictifs du potentiel implantatoire embryonnaire. En l'absence de sélection embryonnaire, il avait été montré que les taux de grossesse cumulés étaient identiques à ceux observés avec une politique de sélection embryonnaire morphologique mais que le délai d'obtention de la grossesse était plus élevé (20). L'observation microscopique étant alors la

seule technologie à disposition des embryologistes, des paramètres de la morphologie embryonnaire ont été utilisés pour grader les embryons disponibles pour le transfert.

### 1°) Stade Zygote

L'apparition, l'augmentation de taille et l'apposition des pronuclei ainsi que les mouvements des nucléoles ont été largement documentés (21). Ainsi des équipes ont travaillé sur l'intérêt prédictif de ces paramètres et ont établi des scores basés sur la morphologie des pronuclei et notamment sur le nombre et l'alignement des nucléoles dans chaque noyau.(22). Ces paramètres ont été repris par le consensus ESHRE qui a proposé une classification des pronuclei en 3 catégories (23,24). Cependant, l'utilisation de ce score précoce est assez limité lorsque le transfert embryonnaire a lieu à un stade plus tardif, son intérêt peu prédictif rendant son utilisation peu fréquente (25).

### 2°) Stade Clivé

La classification des embryons au stade clivé aux deuxième et troisième jours de développement est complexe et prend en compte plusieurs critères : le nombre de blastomères, le pourcentage et la localisation des fragments, l'homogénéité de taille des blastomères et la vitesse de la première division mitotique (23,24) (Figure 2).

<i>Grade</i>	<i>Rating</i>	<i>Description</i>
1	Good	<10% Fragmentation Stage-specific cell size No multinucleation
2	Fair	10–25% Fragmentation Stage-specific cell size for majority of cells No evidence of multinucleation
3	Poor	Severe fragmentation (>25%) Cell-size not stage-specific Evidence of multinucleation

Figure 2 : Classification embryonnaire précoce selon le consensus d'Istanbul



Différentes classifications sont utilisées en France. Celle faisant l'objet d'un consensus des BLEFCO présente l'avantage d'une codification simple et repose sur le nombre de cellules de l'embryon, l'aspect typique des blastomères et le pourcentage de fragments. Les paramètres définissant un embryon de « top » d'un point-de-vue morphologique et donc les plus prédictifs de l'implantation embryonnaire étaient alors la présence de 4-5 blastomères à J2 et au moins 7 à J3, moins de 20% de fragmentation et l'absence de multinucléation (26). Il est également apparu que le temps de survenue du premier clivage (première division mitotique) était un paramètre clé de l'évaluation embryonnaire précoce (27,28). Il est ainsi recommandé de réaliser une lecture embryonnaire microscopique précoce entre 26 et 28 heures post insémination pour évaluer ce paramètre. Alors que de nombreux paramètres ont été décrits comme étant corrélés avec les chances de blastulation et d'implantation, très peu d'études ont porté sur le caractère prédictif de chaque paramètre indépendamment. Cependant, le nombre de cellules, la présence de blastomères de taille homogène et l'absence de multinucléation au deuxième jour étaient les marqueurs les plus prédictifs de blastulation et d'implantation (29,30). Ces données ont été confirmées plus récemment dans une large étude prospective dont les résultats de l'analyse multivariée met en évidence le pouvoir prédictif de naissance vivante du nombre de blastomères, de l'absence de multinucléation et du pourcentage de fragmentation au deuxième jour post insémination (31). Cependant, bien qu'il existe une corrélation entre la présence de paramètres morphologiques embryonnaires précoces et les chances de blastulation ou d'issue positive à la tentative d'AMP, la valeur prédictive de ces marqueurs reste limitée (AUC < 0.7 pour les chances de blastulation) (30). Dans une autre étude prospective, le score embryonnaire précoce montrait une faible valeur prédictive de développement jusqu'au stade blastocyste et les blastocystes ayant donné lieu à une grossesse montraient des valeurs de score embryonnaire précoce identiques à celles de ceux ne s'étant pas implantés (32). La prédictivité de la morphologie embryonnaire précoce semble perdre de sa performance avec l'augmentation de l'âge féminin avec une absence de corrélation entre la morphologie et les chances de grossesse alors que les caractéristiques morphologiques embryonnaires n'évoluent pas avec l'âge (33). De plus, la morphologie embryonnaire précoce ne semble pas être un bon indicateur du statut chromosomique embryonnaire. Ainsi, plusieurs études ont

montré l'absence de corrélation entre la morphologie embryonnaire et le statut de ploïdie (34,35) et des embryons classés comme « top » pouvaient être aneuploïdes.

### 3°) Morula

La morula, qui est le stade survenant habituellement au quatrième jour de développement semble être le stade de développement embryonnaire le moins étudié quant à ses capacités prédictives de l'implantation alors qu'il représente un instant clé du développement embryonnaire pré-implantatoire (15). Il est d'ailleurs rare pour les embryologistes d'observer les embryons au quatrième jour de développement en dehors des contraintes d'organisation dominicales dans une stratégie de transfert après culture prolongée avec un transfert avancé au samedi. Une première équipe a proposé une classification morphologique de la morula basée sur le nombre de blastomères impliqués de le processus de compaction, la morphologie de la masse compacte et la présence de fragments (36). Des observations time lapse ont démontré le caractère évolutif de la morula avec exclusion possible de blastomères de la compaction, compaction totale de tous les blastomères ou exclusion de blastomères en cours de compaction (37). Ces mécanismes d'exclusion correspondraient à des mécanismes d'auto contrôle et de « réparation » de la morula, d'où l'incidence plus élevée d'aneuploïdie pour les embryons présentant ces mécanismes d'exclusion en comparaison avec les morulas totalement compactées. Il a également été démontré que les morulas dont la compaction était totale évoluaient en blastocystes de meilleure qualité morphologique (38). De même, les morulas montrant des signes de compaction totale, semblent être à l'origine des mêmes taux de grossesse qu'au stade blastocyste (39,40). Finalement une classification morphologique de la morula a été intégrée au consensus de l'ESHRE (23,24). De nouvelles études semblent nécessaires pour mieux caractériser ce stade de développement peu observé en routine.

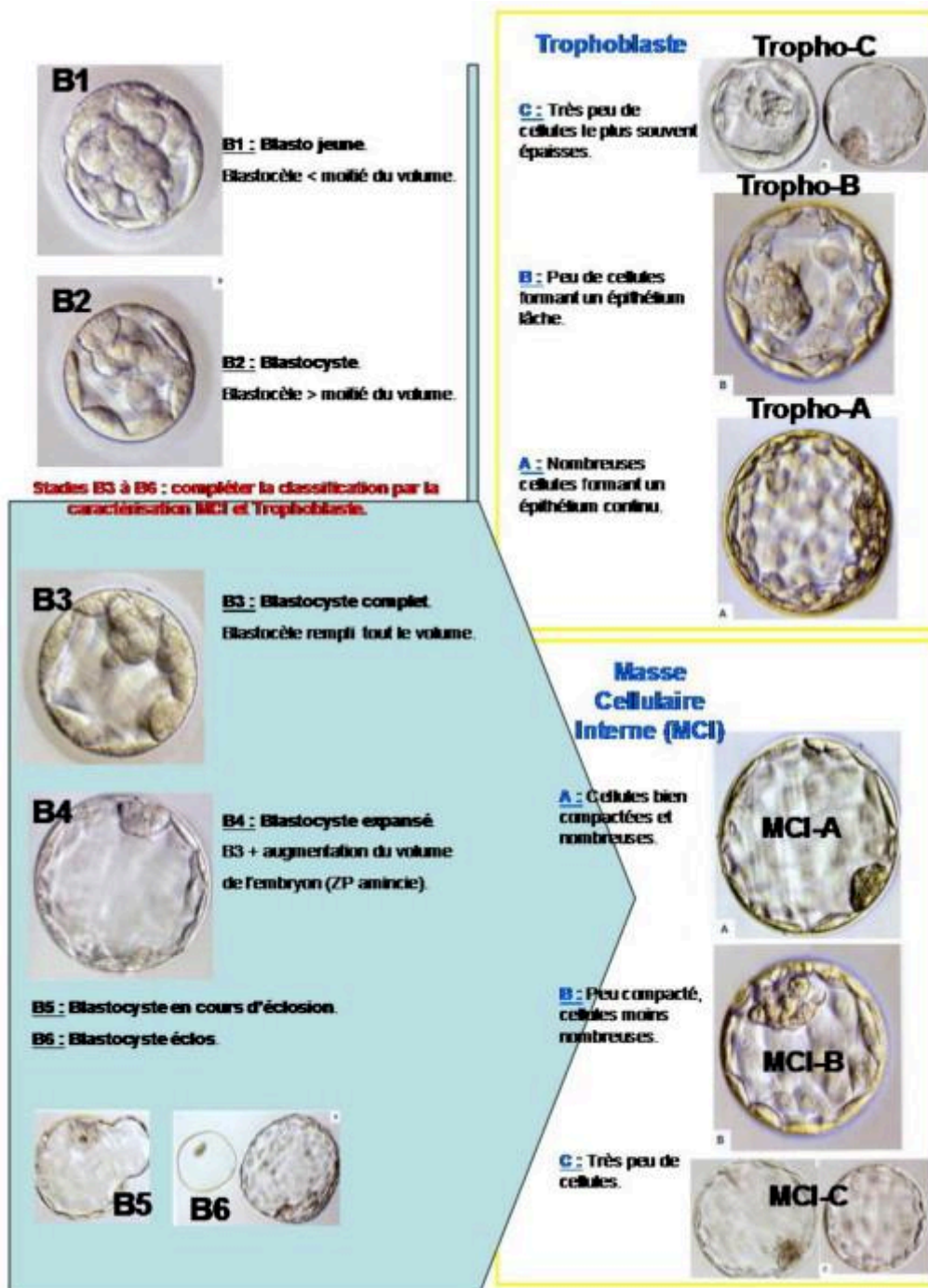
### 4°) Blastocyste

Avec la possibilité de procéder au transfert de blastocystes en routine (fin du quatrième jusqu'au sixième jour de développement), il a été nécessaire de mettre au point un système de classification morphologique de ce stade ultime de culture

embryonnaire in vitro. Gardner et Schoolcraft ont développé un système de classification intégrant le degré d'expansion du blastocœle ainsi que la qualité et le nombre de cellules des deux lignées cellulaires composant le blastocyste : la masse cellulaire interne et le trophoctoderme (41). Cette classification est utilisée en référence dans la majorité des laboratoires d'AMP au niveau international. Une classification proposée par l'ESHRE reprend également l'expansion du blastocyste et l'évaluation du bouton embryonnaire et du trophoctoderme(23,24). Dans une analyse rétrospective de 968 transferts de blastocystes uniques, Ahlstrom a ainsi démontré que le degré d'expansion du blastocœle, la qualité du bouton embryonnaire et du trophoctoderme étaient prédictifs de l'issue du cycle en analyse uni et multivariée. Cependant, la qualité du trophoctoderme semblait être la variable la plus associée aux chances de naissances vivantes (42). Plus récemment, il a été confirmé que la qualité morphologique du trophoctoderme et le degré d'expansion du blastocyste étaient les paramètres morphologiques les plus corrélés aux chances de grossesse et de naissance vivante (43,44). A l'inverse, les travaux d'autres équipes sont plutôt en faveur d'un rôle prépondérant de la qualité du bouton embryonnaire dans les chances de grossesse (45).

Figure 3 : Classification de Gardner et Schoolcraft

Alter L, Boitrelle F, Sifer C. Gynecol Obstet Fertil. 2014 Aug;42(7-8):515-25.



## 5°) Scores combinés

Des scores morphologiques combinant plusieurs éléments observés au cours du développement embryonnaire ont été mis au point afin d'augmenter le pouvoir prédictif de la morphologie embryonnaire sur les chances de grossesse. Ainsi, Holte et al. (29) avaient initialement identifié le nombre de blastomères, l'homogénéité de taille des blastomères et la présence de cellules mononucléées comme étant les éléments les plus prédictifs de l'implantation au cours d'une étude prospective s'intéressant aux transferts de deux embryons au deuxième jour et avaient modélisé un score prédictif de l'implantation à partir de ces variables. De même, Rhenman et al. (31) ont déterminé, sur une large cohorte prospective, que le nombre de blastomères, la présence ou non de cellules multinucléées et le pourcentage de fragmentation étaient les trois éléments les plus prédictifs de la grossesse. Le score établi était valable uniquement pour les transferts d'embryon unique au deuxième jour de développement et était corrélé aux chances de naissance vivante avec plus de 30% de chances de naissance vivante par transfert en cas de transfert d'un embryon avec le meilleur score.

Malgré l'existence d'une association entre la morphologie embryonnaire, principalement au stade blastocyste, et l'issue du cycle de prise en charge en AMP (46), cette corrélation reste limitée avec des taux de grossesse d'en moyenne 50% par transfert d'un blastocyste de bonne qualité morphologique. De plus, l'évaluation morphologique microscopique, bien que soumise à des recommandations sur l'heure de lecture et les éléments à observer, reste soumise à la subjectivité inhérente aux observations humaines. Cette subjectivité est notamment mise en évidence lors des contrôles de qualité internes et externes et l'évaluation morphologique précoce semble souffrir d'une variabilité intra et inter-laboratoire relativement importante (47,48). Il semblerait que l'évaluation morphologique du blastocyste soit plus reproductible même s'il existe des différences entre les opérateurs dans le choix des embryons à transférer (49). Ces derniers éléments renforcent la nécessité de mise en évidence d'autres marqueurs de qualité embryonnaire.

## II - Le PGT-A

Le haut niveau d'aneuploïdie chromosomique dans les gamètes et embryons de l'espèce humaine est une cause majeure reconnue d'échec en FIV et de fausses couches (50). La plupart des aneuploïdies observées sont le résultat d'anomalies de la méiose maternelle et leur fréquence augmente avec l'âge féminin, particulièrement après 35 ans (51). On considère qu'en moyenne, une aneuploïdie est observée dans 21% des ovocytes et 9% des spermatozoïdes(52). Ce seuil de 35 ans coïncide également avec une décroissance des résultats observés en FIV et le lien négatif entre âge féminin et résultats en FIV est établi depuis longtemps (53). Les techniques modernes d'analyse génétique ont permis de bien établir un lien entre l'âge féminin, la baisse de la réserve ovarienne associée et l'augmentation des taux d'aneuploïdie embryonnaire en FIV (54). Ainsi, dans le dernier rapport de la « Society for Assisted Reproductive Technology » qui regroupe tous les résultats des cycles de FIV aux USA de 2016, on peut observer que le taux de naissance vivante par cycle de stimulation avec ponction ovocytaire diminue de 54,5% chez les patientes de moins de 35 ans à 13,3% chez les patientes de 41-42 ans.(55). Ces observations ont été le postulat initial pour le développement et la démocratisation du diagnostic pré-implantatoire d'aneuploïdie (DPI-A) avec comme principe fondateur que le transfert d'un embryon diagnostiqué comme euploïde après biopsie embryonnaire augmenterait les chances d'obtention de la grossesse et diminuerait les risques de fausses couches précoces. Les premières études réalisées dans ce sens ont souffert des limitations liées aux techniques de diagnostic génétique disponibles à l'époque, principalement l'hybridation in situ, et n'avaient pas montré de réel apport du DPI-A dans le cadre de la FIV (56,57). Les difficultés techniques de la biopsie embryonnaire au stade clivé et des techniques de diagnostic génétique sur cellules uniques, associées à la problématique du mosaïsme embryonnaire et de l'impossibilité d'évaluer l'ensemble des chromosomes (seul un panel de chromosomes les plus fréquemment impliqués dans les translocations était étudié) étaient incriminées dans l'absence de bénéfice du DPI-A par rapport à l'évaluation morphologique classique. Les années 2010 ont cependant connu une révolution dans les techniques de diagnostic génétique avec la possibilité d'étudier l'ensemble des chromosomes, initialement avec des puces d'hybridation génomique comparative (CGH array) et plus récemment avec les techniques de réaction en chaîne par polymérase

quantitative (qPCR) et le séquençage de nouvelle génération (NGS) (58,59). Contrairement à la FISH, les techniques de NGS permettent un séquençage du génome embryonnaire et donc un accès à des informations génétiques autres que le simple statut de ploïdie embryonnaire et donc une réflexion éthique (60–62)

Cette évolution est survenue en parallèle de l'amélioration de la culture embryonnaire prolongée et la démocratisation de la biopsie de trophoctoderme au stade blastocyste. L'analyse étant effectuée à partir de cellules ne prenant pas part à la partie fœtale de l'embryon, une des critiques à la biopsie sur cellules du trophoctoderme résidait dans la possibilité de ne pas être représentative de l'état chromosomique du bouton embryonnaire. Cependant, plusieurs études portant sur la réanalyse de blastocystes entiers après biopsie de trophoctoderme sont rassurantes et montrent une bonne concordance entre les résultats issus de la biopsie et le statut chromosomique total (63,64). La biopsie embryonnaire implique également une politique de transfert après congélation totale de la cohorte embryonnaire. Depuis, de nombreux essais cliniques ont mis en évidence le bénéfice du DPI-A pour l'amélioration des résultats en FIV par bien que son indication systématique soit toujours débattue. Le dernier rapport de la « Society for Assisted Reproductive Technology » est concordant avec ces données puisqu'il ne montre pas d'impact de l'âge féminin sur les résultats après transfert d'un embryon euploïde congelé (55). Cette stratégie permettrait ainsi de diminuer le temps nécessaire à l'obtention de la grossesse en transférant en premier un embryon avec de meilleures chances d'implantation mais finalement n'augmenterait pas les chances de succès globales par tentative. Certaines équipes montrent pas de supériorité du DPI-A chez les patientes de moins de 40 ans et mettent en évidence la difficulté d'obtention d'embryons à biopsier pour le groupe des femmes de plus de 40 ans (65). De même Murphy et al ont montré un avantage du DPI-A sur les chances de naissances vivantes par transfert qu'à partir de 38 ans (61). Une problématique liée au diagnostic réalisé sur peu de cellules réside dans la mise en évidence de mosaïques chromosomiques et de la question du devenir de ces embryons. Il apparaît que jusqu'à 13% des blastocystes biopsiés mettent en évidence ces mosaïques après analyse NGS (66). Peu de données existent sur les issues des cycles après transfert des blastocystes présentant une mosaïque mais des naissances vivantes ont été observées bien que les taux de grossesses soient plus bas que ceux observés après

le transfert d'un blastocyste euploïde (67). De plus, l'impact médico-économique du DPI-A reste un argument majeur dans la critique de son utilisation systématique (68). Il ne faut également pas oublier que le DPI-A est une méthode invasive pouvant avoir un impact sur le développement embryonnaire et donc sur le potentiel implantatoire de l'embryon (69) bien qu'un essai multicentrique prospectif ait récemment conclu à l'absence d'impact de la biopsie embryonnaire sur les chances de grossesse en comparaison avec un groupe contrôle (70). C'est dans le cadre des lois relatives à la bioéthique de 1994, 2004 et 2011, ainsi que l'application du décret de 2006 relatif au diagnostic prénatal et au diagnostic biologique effectué à partir de cellules biologiques prélevées sur l'embryon in vitro que la pratique du DPI est autorisée en France à titre exceptionnel pour les couples risquant de transmettre à l'enfant à naître une maladie génétique grave et incurable au moment du diagnostic. Seule la recherche de remaniements chromosomiques préalablement identifiés chez un des futurs parents est possible alors que le DPI-A ne sera a priori toujours pas autorisé après la révision 2020 de la loi de Bioéthique. Un programme hospitalier de recherche clinique national (DEVIT) va démarrer pour évaluer son intérêt dans la pratique française. Au final, il apparaît nécessaire qu'un consensus autour du recours au DPI-A soit trouvé (71) et de développer en parallèle des approches non invasives d'évaluation du potentiel implantatoire embryonnaire.

### **III - Le Time Lapse**

Les systèmes de time-lapse combinent trois éléments de base : un incubateur, un microscope optique et un logiciel. En intégrant ces éléments, une surveillance continue est assurée tout en maintenant des conditions de culture optimales. Par conséquent, ils permettent une observation continue des événements du développement de l'embryon (72) contribuant ainsi à une meilleure compréhension des mécanismes de la fécondation et du développement morphologique pré-implantatoire. Depuis leur utilisation en routine dans les laboratoires d'AMP, de nouveaux marqueurs cinétiques et leurs corrélations avec la qualité des embryons et le potentiel d'implantation ont été identifiés



## Article 1

Le time-lapse : bilan et perspectives en 2019

Apparue dans les années 2010, la technologie time-lapse a immédiatement généré beaucoup d'intérêt et s'est rapidement développée dans de nombreux laboratoires. Alors que l'intérêt de cette technologie pour optimiser les conditions de culture embryonnaire et améliorer l'évaluation de la qualité embryonnaire est généralement reconnu, son apport réel pour l'amélioration des chances de succès des couples reste toujours débattu dans la littérature. Nous avons ici procédé à un exposé des avantages de la technologie time lapse, de ses limites et perspectives



# Le *time-lapse* : bilan et perspectives en 2019

## Time-lapse imaging: state-of-the-art and future perspectives

Arnaud Reignier<sup>1,2,3</sup>  
 Julie Firmin<sup>1</sup>  
 Jenna Lammers<sup>1</sup>  
 Paul Barriere<sup>1,2,3</sup>  
 Thomas Freour<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Service de biologie et médecine de la reproduction, CHU de Nantes

<sup>2</sup> Inserm UMR1064

<sup>3</sup> Faculté de médecine, université de Nantes  
 <thomas.freour@chu-nantes.fr>

**Résumé.** Apparue dans les années 2010, la technologie *time-lapse* a immédiatement généré beaucoup d'intérêt et s'est rapidement développée dans de nombreux laboratoires. Alors que l'intérêt de cette technologie pour optimiser les conditions de culture embryonnaires et améliorer l'évaluation de la qualité embryonnaire est généralement reconnu, son apport réel pour l'amélioration des chances de succès des couples reste toujours débattu dans la littérature. Malgré certaines limites, l'utilisation du *time-lapse* permet néanmoins d'envisager des perspectives prometteuses en recherche et en fécondation *in vitro*.

**Mots clés :** *time-lapse*, développement embryonnaire, fécondation *in vitro*

**Abstract.** Appeared in the 2010s, *time-lapse* technology immediately generated a lot of interest and was rapidly implemented in several IVF laboratories. While the interest of this technology in optimizing embryonic culture conditions and improving the evaluation of embryonic quality is generally recognized, its real contribution to improving couples' chances of success in IVF is still debated in the literature. Despite certain limitations, the use of *time-lapse* nevertheless makes it possible to envisage promising prospects, both in research and in vitro fertilization.

**Key words:** Time-lapse, embryo development, in vitro fertilization

Apparue dans les années 2010, la technologie du *time-lapse* a immédiatement généré beaucoup d'intérêt et s'est rapidement développée dans de nombreux laboratoires. Alors que l'intérêt de cette technologie pour optimiser les conditions de culture embryonnaires et améliorer l'évaluation de la qualité embryonnaire est généralement reconnu, son apport réel pour l'amélioration des chances de succès des couples reste toujours débattu dans la littérature. Malgré certaines limites, l'utilisation du *time-lapse* offre des perspectives prometteuses en recherche et en fécondation *in vitro* (FIV). Dans cette revue, nous proposons de rappeler le principe du *time-lapse*, puis de présenter une synthèse de la littérature disponible sur l'apport clinique du *time-lapse*, et, enfin, de discuter les limites et les perspectives de cette technologie.

### Principe du *time-lapse*

Depuis les débuts de la FIV, la technique de référence pour

l'évaluation de la qualité embryonnaire, et donc pour le choix de l'embryon à transférer, repose sur l'observation microscopique qualitative de la morphologie embryonnaire. Les consensus des sociétés savantes ont défini les caractéristiques du développement embryonnaire précoce corrélées avec les chances de succès. Il s'agit du nombre, de la taille et de la régularité des cellules, de l'apparence du cytoplasme et de la présence de noyaux [1]. Cette observation répétée de la morphologie embryonnaire impose un examen quotidien des boîtes de culture sous le microscope, exposant les embryons à des conditions non optimales de température, d'atmosphère et de luminosité. De plus, l'ouverture répétée des incubateurs pour sortir puis remettre chaque boîte de culture lors de l'évaluation morphologique aboutit également à des perturbations prolongées des conditions de culture à l'intérieur même des incubateurs, du fait du temps assez long nécessaire à la récupération de conditions équilibrées [2]. Ces limites bien connues

Médecine  
de la **Reproduction**

Tirés à part : T. Freour

ont abouti à la recherche de solutions techniques permettant à la fois d'optimiser les conditions de culture embryonnaire et leur évaluation morphologique. Les systèmes *time-lapse*, déjà connus pour d'autres applications, en culture cellulaire notamment, ont ainsi été développés et adaptés à la FIV chez l'homme, permettant un excellent compromis entre l'étude approfondie et continue du développement embryonnaire préimplantatoire et le maintien de conditions de culture optimales [3].

Le principe du *time-lapse* est de coupler l'incubateur et le microscope au sein d'un même appareil, permettant ainsi l'observation sans manipulation des ovocytes et embryons jusqu'au moment du transfert ou de la congélation. Chaque ovocyte ou embryon est photographié à intervalle régulier par un microscope situé à l'intérieur de l'incubateur, sans nécessité d'ouvrir la chambre d'incubation. Ces images successives, prises 24 h sur 24, sont enregistrées et restituées sous forme de vidéo (*time-lapse*) présentant le déroulement du développement embryonnaire. À la fin des années 1990, une première publication pilote a présenté le principe du *time-lapse* et son application possible en embryologie humaine en décrivant les phénomènes liés à la fécondation [4]. Une dizaine d'années plus tard, une étude rapportant pour la première fois l'observation du développement embryonnaire jusqu'au stade de blastocyste a été publiée [5]. Il existe aujourd'hui plusieurs modèles commerciaux de systèmes *time-lapse*, certains à intégrer dans des incubateurs (Primovision<sup>®</sup>), d'autres combinant les deux systèmes dans un même équipement (Embryoscope<sup>®</sup>, Geri<sup>®</sup>, MiriTL<sup>®</sup>, etc.). Les différences principales entre ces appareils concernent le type de microscope, les modèles de boîtes utilisées pour la culture embryonnaire et les logiciels d'annotation embryonnaire. Le principe d'observation répétée d'images dans des conditions stables reste cependant le même.

L'avènement des systèmes *time-lapse* a fait émerger le concept de paramètres morphocinétiques du développement embryonnaire. Ces paramètres regroupent les aspects morphologiques traditionnels (nombre, taille, régularité des blastomères, expansion du blastocyste, etc.) en les associant à leur cinétique précise d'apparition. La première publication d'envergure portant sur la description et l'intérêt de ces paramètres morphocinétiques en FIV chez l'homme date de 2011 [6]. Le résultat est l'heure à laquelle se sont produites les divisions cellulaires successives : t2, t3, t4, etc. pour les passages à deux cellules, à trois, à quatre, etc. L'évaluation morphocinétique permet également de mesurer précisément de nouveaux paramètres, tels que la durée des cycles cellulaires ou la synchronie de division. De plus, certains phénomènes anormaux ont pu être facilement observés et intégrés à l'évaluation de la qualité embryonnaire (clivage direct d'une cellule en plus de deux cellules filles, fusion cellulaire de deux blastomères, réabsorption de fragments,

exclusion de cellules lors du processus de compaction, etc.). Devant l'avènement de ces nombreux nouveaux paramètres et dans un souci de standardisation, des recommandations sur la nomenclature à utiliser et les éléments à observer ont été publiées dès 2014 [7]. Depuis lors, de très nombreuses études ont évalué l'intérêt de ces paramètres morphocinétiques, seuls ou combinés sous forme de modèle, pour la prédiction de la qualité embryonnaire et des chances de grossesse.

## Bilan de l'intérêt clinique du *time-lapse*

Depuis les années 2010, le nombre d'études utilisant la technologie *time-lapse* est en constante augmentation. Ainsi, on dénombre, sur la base de données Medline-Pubmed près de 220 articles répondant aux mots-clés « *time-lapse* », « culture », « embryon » et « humain », plus de la moitié de ces études ayant été publiées ces trois dernières années (*figure 1*). Cela illustre le recours croissant à ces systèmes d'incubation avec caméra embarquée pour la culture des embryons humains obtenus en FIV depuis les premières études sur leur utilisation en routine [6, 8]. Pour autant, quelle est la place de ces systèmes *time-lapse* en pratique clinique et quels bénéfices attendre de cette technologie ?

Même si la littérature est abondante sur l'utilisation des systèmes *time-lapse* en clinique, les études ayant un haut niveau de preuve scientifique sont rares, qu'il s'agisse de méta-analyses ou d'essais contrôlés randomisés. Nous ne discuterons pas ici en détail des très nombreuses études rétrospectives de cohorte ou cas-témoin disponibles dans la littérature. Cependant, et malgré leurs biais potentiels, la grande majorité de ces études concluent à une amélioration des chances de succès en FIV grâce à l'utilisation des systèmes *time-lapse*, par comparaison au système conventionnel. Quelques essais contrôlés randomisés ont tenté d'évaluer l'intérêt clinique des systèmes *time-lapse*. Cependant, les méthodes, les populations de patients et

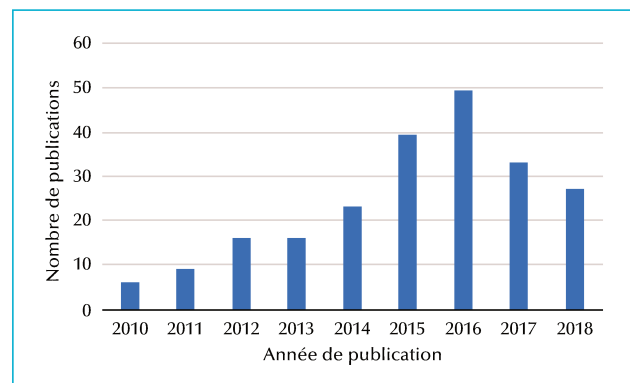


Figure 1. Diagramme de répartition du nombre d'occurrences dans la base de données PubMed entre 2010 et 2018.

les points de mesure choisis dans ces essais randomisés étaient très hétérogènes, aboutissant à des conclusions divergentes. Certaines études suggéraient ainsi que le suivi des embryons en système *time-lapse* n'aurait pas de bénéfice clinique par rapport aux incubateurs avec évaluation morphologique conventionnelle [9-15]. À l'inverse, d'autres essais randomisés concluaient à une amélioration des taux d'implantations, de grossesses cliniques et/ou de naissances vivantes [16-19], et à une diminution du taux de fausses couches [16], par utilisation des systèmes *time-lapse*. La part respective, tenue dans ces bons résultats, de l'amélioration des conditions de culture et du perfectionnement de l'évaluation de la qualité embryonnaire grâce au *time-lapse* n'est pas encore précisément établie.

Depuis 2014, cinq revues systématiques (avec méta-analyse) ont été réalisées afin de déterminer l'intérêt des systèmes *time-lapse* par rapport à des systèmes d'incubation conventionnelle [20-24]. Elles permettent d'évaluer deux bénéfices théoriques des systèmes *time-lapse* :

- l'amélioration des conditions de culture embryonnaire par rapport aux incubateurs conventionnels,
- l'amélioration de l'évaluation de la qualité embryonnaire, grâce aux paramètres morphocinétiques, par rapport à l'évaluation morphologique conventionnelle.

Les résultats des premières méta-analyses [23, 24] sont intéressants, mais sont désormais dépassés, suite à la publication récente de plusieurs études prospectives randomisées [13-19].

Plus récemment, en 2017, la méta-analyse de Pribensky et al. [22] a évalué l'impact de la sélection embryonnaire grâce à des paramètres morphocinétiques sur les issues cliniques. Les auteurs concluaient, sur un ensemble de cinq études incluant 1 637 patientes randomisées [10, 14, 16, 17, 25], que la sélection des embryons en système *time-lapse* était associée à une augmentation significative des taux de naissances vivantes (odds ratio [OR] = 1,668 IC95% = [1,134-2,455],  $p = 0,009$ ,  $n = 481$ ) ainsi que des taux de grossesses cliniques (OR = 1,542 IC95 % = [1,211-1,965],  $p < 0,001$ ,  $n = 1 637$ ), et à une diminution des taux de fausses couches précoces (OR = 0,662 IC95 % = [0,469-0,935],  $p = 0,019$ ,  $n = 904$ ).

Une autre méta-analyse a été publiée en 2017 [21], incluant six études [10, 12-14, 26, 27]. Cependant, le manque d'exhaustivité de cette revue systématique doit être souligné, puisque deux essais contrôlés randomisés [11, 16] déjà publiés à cette époque, n'y ont pas été inclus. L'un des intérêts de cette étude, néanmoins, est qu'elle s'attachait, pour la première fois, à étudier séparément l'apport respectif de l'incubation en système *time-lapse* et de l'évaluation morphocinétique par rapport à la culture en incubateur conventionnel et à l'évaluation morpholo-

gique standard. Cette revue ne mettait pas en avant de différence significative pour les taux de grossesses cliniques. Une différence était néanmoins notée pour les taux de naissances vivantes (RR = 1,23 IC95 % = [1,06-1,44]  $n = 842$  patientes), mais une seule des six études incluses avait analysé ce critère de jugement.

Enfin, la revue systématique de la Cochrane parue récemment [20], portant sur huit essais contrôlés randomisés [10, 11, 13-16, 27, 28], concluait à l'absence de différence significative pour les taux de naissances vivantes (OR = 0,73 IC95 % = [0,47-1,13]), les taux de grossesses cliniques et les taux de fausses couches (OR = 2,25 IC95 % [0,84-6,02]) entre le *time-lapse* et les incubateurs conventionnels.

Ces revues de la littérature aboutissent donc à des conclusions sensiblement différentes, malgré une méthodologie apparemment rigoureuse. Il est à noter que la publication de chacune de ces méta-analyses a donné lieu à de nombreuses critiques de part et d'autre, notamment méthodologiques. Le débat entre les « pour » et les « contre » sur l'intérêt clinique réel du *time-lapse* reste donc ouvert, et il est difficile de trouver une réponse unique dans la littérature à ce jour.

Comme montré précédemment, les conclusions des études prospectives randomisées sur l'intérêt clinique du *time-lapse* divergent. En parallèle, la majorité des études rétrospectives publiées à ce jour concluent plutôt à un intérêt clinique du *time-lapse*. À noter qu'aucune étude n'a montré un effet délétère du *time-lapse* sur l'issue des cycles. Cependant, toutes les équipes s'accordent à dire que le niveau de preuve scientifique des études disponibles est modéré, avec un risque de biais, y compris pour les rares essais contrôlés randomisés disponibles à ce jour, qui ont porté sur des effectifs assez limités, des populations hétérogènes (causes de l'infertilité, origine des ovocytes, jour du transfert embryonnaire et nombre d'embryons transférés, etc.) et ont utilisé des critères de jugement principaux variables.

## Limites du *time-lapse*

Malgré ses nombreux avantages, la technologie *time-lapse* présente également un certain nombre de limites qui sont régulièrement soulignées par ses détracteurs. Le principal inconvénient généralement cité par les professionnels concernant le *time-lapse* est son coût élevé. Ainsi, 50 % des biologistes français d'assistance médicale à la procréation (AMP) ne possédant pas de système *time-lapse* identifient l'aspect financier comme frein principal à la mise en place cette technologie [29]. Le coût d'achat des automates *time-lapse*, ainsi que celui des consommables spécifiques et de la maintenance, est effectivement assez élevé par comparaison aux autres incubateurs utilisés en FIV. Cependant, il est réducteur de ne considérer que ces

coûts directs dans l'évaluation financière de cette technologie. Comme cela est présenté plus largement dans un autre chapitre de cet article, le *time-lapse* présente de nombreux avantages qui participent à optimiser la prise en charge des couples et l'organisation du laboratoire, éléments indirectement mais significativement bénéfiques sur le plan financier. Tout d'abord, l'amélioration des conditions de culture et de l'évaluation de la qualité embryonnaire aboutit à une meilleure efficacité du laboratoire. L'enregistrement des données permet également une large flexibilité dans l'organisation quotidienne du laboratoire en supprimant les contraintes horaires habituelles. De plus, la consommation de gaz, de milieu de culture et d'huile est diminuée. Enfin, le *time-lapse* peut participer à l'attractivité du centre et donc générer une activité supplémentaire.

L'évaluation de la qualité embryonnaire dans les systèmes *time-lapse* repose principalement sur l'annotation des paramètres morphocinétiques pour chacun des embryons. Cette annotation est moins subjective que l'évaluation morphologique conventionnelle, mais il est impératif de standardiser les pratiques au sein d'une équipe où plusieurs opérateurs participeraient à cette activité, afin de maintenir la pertinence et la reproductibilité de l'évaluation de la qualité embryonnaire. Des guides d'annotation ont été publiés [7]. Leur utilisation, associée à des contrôles qualité internes réguliers, est recommandée pour optimiser et homogénéiser les annotations du développement embryonnaire.

Alors que l'intérêt clinique des paramètres morphocinétiques et des modèles prédictifs issus du *time-lapse* a été largement évoqué dans de nombreuses études, leur pertinence reste cependant toujours discutée par certains auteurs [30]. Parmi les points soulevés par les détracteurs de l'utilisation clinique du *time-lapse*, la performance limitée des modèles prédictifs en dehors du centre où ils ont été développés est régulièrement citée [31]. En effet, les rares études de validation externe ont rapporté des résultats inférieurs à ceux obtenus initialement [32]. Le développement de modèles prédictifs à partir de très larges populations de patients issus de nombreuses cliniques devrait permettre de les rendre plus généralisables [33]. Un autre aspect récemment souligné dans la littérature concerne un risque de biais statistique dû à l'association entre les paramètres morphocinétiques d'une cohorte embryonnaire issue d'un couple et ses caractéristiques cliniques [34]. Ce risque de biais impose la réalisation d'une analyse statistique des données morphocinétiques plus complexe que celle réalisée dans la majorité des études disponibles afin de conclure précisément sur leur capacité à prédire la compétence implantatoire d'un embryon chez un couple donné.

Enfin, l'absence d'étude clinique de haut niveau sur l'intérêt clinique du *time-lapse* est souvent mise en avant par les opposants au *time-lapse* pour critiquer ou

déconseiller son utilisation. Il est intéressant de noter, tout d'abord, que de telles études de haut niveau n'existent pas non plus pour la majorité des techniques mises en œuvre au quotidien dans tous les laboratoires de FIV, en particulier l'évaluation morphologique conventionnelle de la qualité embryonnaire. Par ailleurs, si les études randomisées de grande ampleur prenant le taux de naissances comme point final restent le *gold standard* en recherche clinique, leur financement et leur organisation pratique et réglementaire présentent de nombreux obstacles. De plus, leurs critères d'inclusion peuvent aboutir à des conclusions qui ne concernent qu'une partie de la population infertile et pas la population « tout venant ». Par ailleurs, le choix des points de mesure conditionne la pertinence de ces études randomisées. La littérature sur le *time-lapse* contient par exemple des études randomisées bien construites mais prenant des points de mesure très discutables d'un point de vue clinique [13]. A contrario, la première étude clinique randomisée sur l'intérêt du *time-lapse* a été exagérément critiquée, sans raison évidente d'un point de vue méthodologique [16]. Plusieurs méta-analyses ont tenté de synthétiser les données issues de ces études randomisées, mais avec des résultats contradictoires [20, 22]. L'hétérogénéité des études incluses dans ces méta-analyses limite pour l'instant la pertinence de leurs conclusions. En parallèle, les études de cohorte bien menées peuvent générer des données de qualité, sous réserve de connaître les biais inhérents à ce type d'étude.

Dans ce contexte, on peut s'interroger, éthiquement parlant, sur la décision de limiter le recours au *time-lapse* à la recherche clinique, au titre qu'aucune étude randomisée ne conclut formellement à son intérêt, alors que, dans le même temps, de nombreuses études de cohorte semblent indiquer les bénéfices potentiels de cette technologie.

## Perspectives du *time-lapse*

### Automatisation de l'analyse morphocinétique

Bien que la technologie *time-lapse* permette une lecture et une annotation continue du développement embryonnaire préimplantatoire, ces dernières sont actuellement toujours réalisées de façon manuelle, et nécessitent l'intervention d'un personnel formé. Au-delà du temps nécessaire à cette annotation manuelle, un risque théorique de variabilité intra- et interopérateur existe, même si plusieurs études ont démontré que cette variabilité était très limitée et bien inférieure à celle observée en évaluation morphologique conventionnelle [35, 36].

L'automatisation ou la semi-automatisation de la détection des événements du développement permettrait

une standardisation des annotations embryonnaires ainsi qu'une plus grande précision, et faciliterait l'exploitation de bases de données multicentriques. Plusieurs outils allant dans ce sens et utilisant des approches complémentaires sont en cours de développement. Une étude pilote sur un nombre restreint d'embryons a montré une corrélation entre les variations des niveaux de gris au sein de l'image provenant du système *time-lapse* et la détection des événements morphocinétiques [37]. Notre équipe a confirmé l'intérêt de cette approche et amélioré sa performance, grâce à la détection de l'amincissement de la zone pellucide, offrant ainsi une meilleure annotation au stade blastocyste [38].

Des systèmes commerciaux d'annotation partiellement automatisée existent. Un premier dispositif utilisant une détection automatique des stades deux, trois et quatre cellules (Eeva<sup>®</sup> test, Merck Serono) et couplé à la morphologie conventionnelle a été mis sur le marché il y a quelques années. Cependant, ce système, dans sa première version, n'a pas fait la preuve de sa supériorité sur les stratégies plus classiques de sélection embryonnaire [39]. Une évolution de cet algorithme (Eeva<sup>®</sup> Xtend algorithm, Merck Serono) associée à un système *time-lapse* plus complet devrait être plus performante, sous réserve de sa validation clinique. Un outil d'aide à l'annotation a également été mis au point par Vitrolife<sup>®</sup> (Embryoscope Guided Annotation<sup>®</sup>), mais il consiste à repérer les périodes d'intérêt avec activité cellulaire, pas à faire l'annotation de façon autonome.

D'autres stratégies, utilisant les outils d'intelligence artificielle, sont actuellement en cours de développement et offrent des perspectives prometteuses d'annotation automatique du développement, mais aussi d'évaluation automatisée de la morphologie embryonnaire [40].

### Associations de la morphocinétique avec d'autres marqueurs de qualité embryonnaire

L'amélioration de l'évaluation de la qualité embryonnaire passera certainement par l'association de marqueurs d'origine différente : cinétique de développement, morphologie, protéomique et métabolomique du milieu de culture [41]. Alors que de nombreuses équipes explorent cette stratégie combinée, très peu d'études sont disponibles à ce jour. Une étude pilote a montré que la combinaison de paramètres morphocinétiques embryonnaires et du dosage de l'IL-6 dans le milieu de culture au stade blastocyste au sein d'un même algorithme décisionnel était prédictive des chances d'implantation [42]. L'incorporation de systèmes de microfluidique permettant la réalisation de dosages en continu dans les milieux de culture pourraient représenter l'avenir des systèmes *time-lapse* sous forme de plateforme « tout en un » [43].

## Recherche fondamentale

Les systèmes *time-lapse* offrent la possibilité d'observer et de décrire de façon précise et objective tous les événements du développement embryonnaire préimplantatoire *in vitro* [44], mais aussi des mécanismes bien plus précis tels que l'organisation de la chromatine ovocytaire [45] ou l'expression de marqueurs spécifiques de lignées cellulaires [46], lorsqu'ils sont associés à d'autres technologies d'imagerie. L'identification de marqueurs protéiques pertinents grâce à l'exploration du transcriptome et du protéome embryonnaire à différents stades de développement pourra permettre à l'avenir le développement d'outils d'imagerie non invasive intégrés aux systèmes *time-lapse* [47].

## Outil de formation et d'évaluation

L'utilisation des grilles de consensus pour l'annotation des paramètres morphocinétiques [7] permet l'harmonisation des pratiques et contribue à réduire fortement la variabilité intra- et interopérateur dans l'évaluation de la morphologie embryonnaire [36]. Ces systèmes représentent donc un outil de formation, d'habilitation et de suivi des compétences des opérateurs tout à fait adapté pour la mise en place et le maintien d'une politique qualité rigoureuse.

**Liens d'intérêt :** Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## Références

1. ALPHA scientists in reproductive medicine; ESHRE special interest group embryology. . The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011 ; 26 : 1270-83.
2. Swain JE, Carrell D, Cobo A, Meseguer M, Rubio C, Smith GD. Optimizing the culture environment and embryo manipulation to help maintain embryo developmental potential. *Fertil Steril* 2016 ; 105 (3):571-87.
3. 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* 2016 ; 22 : 2-22.
4. Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using *time-lapse* video cinematography. *Hum Reprod* 1997 ; 12 : 532-41.
5. Mio Y, Maeda K. *Time-lapse* cinematography of dynamic changes occurring during *in vitro* development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol* 2008 ; 199 : 660.
6. Meseguer M1, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011 ; 26 : 2658-71.
7. Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, et al. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo

- monitoring by a *time-lapse* user group. *Hum Reprod* 2014 ; 29 : 2650-60.
8. Pribenszky C, Mátyás S, Kovács P, Losonczi E, Zádori J, Vajta G. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by *time-lapse* monitoring. *Reprod Biomed Online* 2010 ; 21 : 533-6.
9. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Grondahl ML, Kesmodel US, Ingerslev HJ. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a *time-lapse* incubator. *J Assist Reprod Genet* 2012 ; 6 : 565-72.
10. Kahraman S, Cetinkaya M, Pirkevi C, Yelke H, Kumtepe Y. Comparison of blastocyst development and cycle outcome in patients with eSET using either conventional or *time-lapse* incubators. A prospective study of good prognosis patients. *J Reprod Stem Cell Biotech* 2013 ; 3 : 55-61.
11. Kovacs P, Matyas SZ, Forgacs V, et al. Can a composite score based on *time-lapse* observation aid embryo selection for single embryo transfer; an interim report. *Hum Reprod* 2013 ; 28(Suppl 1):169.
12. Insua MF, Cobo A, Larreategui Z, Ferrando M, Remohi J, Meseguer M. Obstetric and perinatal outcomes of singleton newborns using *time-lapse* monitoring. *Fertil Steril* 2015 ; 104 : e212-3.
13. Park H, Bergh C, Selleskog U, Thurin-Kjellberg A, Lundin K. No benefit of culturing embryos in a closed system compared with a conventional incubator in terms of number of good quality embryos: results from an RCT. *Hum Reprod* 2015 ; 30 : 268-75.
14. Goodman LR, Goldberg J, Falcone T, Austin C, Desai N. Does the addition of *time-lapse* morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2016 ; 105 : 275-85.
15. Kaser DJ, Bormann CL, Missmer SA, Farland LV, Ginsburg ES, Racowsky C. A pilot randomized controlled trial of Day 3 single embryo transfer with adjunctive *time-lapse* selection versus Day 5 single embryo transfer with or without adjunctive *time-lapse* selection. *Hum Reprod* 2017 ; 32 : 1598-603.
16. Rubio I, Galán A, Larreategui Z, et al. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil Steril* 2014 ; 102 : 1287-94.
17. Siristatidis C, Komitopoulou MA, Makris A, et al. Morphokinetic parameters of early embryo development via *time-lapse* monitoring and their effect on embryo selection and ICSI outcomes: a prospective cohort study. *J Assist Reprod Genet* 2015 ; 32 : 563-70.
18. Alhelou Y, Mat Adenan NA, Ali J. Embryo culture conditions are significantly improved during uninterrupted incubation: a randomized controlled trial. *Reprod Biol* 2018 ; 18 : 40-5.
19. Kovacs P, Matyas S, Forgacs V, Sajgo A, Molnar L, Pribenszky C. Non-invasive embryo evaluation and selection using *time-lapse* monitoring: results of a randomized controlled study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2019 ; 233 : 58-63.
20. Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Farquhar C. *Time-lapse* systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2018 ; 5 : CD011320.
21. Chen M, Wei S, Hu J, Yuan J, Liu F. Does *time-lapse* imaging have favorable results for embryo incubation and selection compared with conventional methods in clinical *in vitro* fertilization? A meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. *PLoS One* 2017 ; 12 : e0178720.
22. Pribenszky C, Nilselid AM, Montag M. *Time-lapse* culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2017 ; 35 : 511-20.
23. Kaser DJ, Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with timelapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2014 ; 20 : 617-31.
24. Polanski LT, Coelho Neto MA, Nastri CO, et al. *Time-lapse* embryo imaging for improving reproductive outcomes: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014 ; 44 : 394-401.
25. Kovacs P, Matyas S, Forgacs V, Sajgo A, Molnar L, Pribenszky C. Embryo selection by *Time-lapse* monitoring for single embryo transfer ('SET'). clinicaltrials.gov, 2017; ClinicalTrials.gov Identifier : NCT01694641.
26. Matyas SZ, Kovacs P, Forgacs V, Sajgo A, Pribenszky CS. Selection of single blastocyst for transfer using *time-lapse* monitoring during *in vitro* fertilization in good prognosis patients: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2015 ; 30 : 119.
27. Wu YG, Lazzaroni-Tealdi E, Wang Q, et al. Different effectiveness of closed embryo culture system with *time-lapse* imaging (EmbryoScope™) in comparison to standard manual embryology in good and poor prognosis patients: a prospectively randomized pilot study. *Reprod Biol Endocrinol* 2016 ; 14 : 49.
28. Yang L, Kong X, Zhang S, et al. Single embryo transfer on cleavage-stage(D3) using timelapse selection vs. on blastocyst(D5) using traditional morphological selection in patients with good prognosis: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2017 ; 32(Suppl 1):i102-3.
29. Boueilh T, Reignier A, Barriere P, Freour T. *Time-lapse* imaging systems in IVF laboratories: a French national survey. *J Assist Reprod Genet* 2018 ; 35 : 2181-6.
30. Paulson RJ, Reichman DE, Zaninovic N, Goodman LR, Racowsky C. *Time-lapse* imaging: clearly useful to both laboratory personnel and patient outcomes versus just because we can doesn't mean we should. *Fertil Steril* 2018 ; 109 : 584-91.
31. Storr A, Venetis C, Cooke S, Kilani S, Ledger W. *Time-lapse* algorithms and morphological selection of day-5 embryos for transfer: a preclinical validation study. *Fertil Steril* 2018 ; 109 : 276-83.
32. Fréour T, Le Fleuter N, Lammers J, Spingart C, Reignier A, Barrière P. External validation of a *time-lapse* prediction model. *Fertil Steril* 2015 ; 103 : 917-22.
33. Petersen BM, Boel M, Montag M, Gardner DK. Development of a generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on Day 3. *Hum Reprod* 2016 ; 31 : 2231-44.
34. Kirkegaard K, Sundvall L, Erlandsen M, Hindkjaer JJ, Knudsen UB, Ingerslev HJ. Timing of human preimplantation embryonic development is confounded by embryo origin. *Hum Reprod* 2016 ; 31 : 324-31.
35. Sundvall L, Ingerslev HJ, Breth Knudsen U, Kirkegaard K. Inter- and intra-observer variability of *time-lapse* annotations. *Hum Reprod* 2013 ; 28 : 3215-21.



36. Martínez-Granados L, Serrano M, González-Utor A, et al. Inter-laboratory agreement on embryo classification and clinical decision: conventional morphological assessment vs. *time-lapse*. *PLoS One* 2017 ; 12 : e0183328.
37. Mölder A, Drury S, Costen N, Hartshorne GM, Czanner S. Semiautomated analysis of embryoscope images: using localized variance of image intensity to detect embryo developmental stages. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 2015 ; 87 : 119-28.
38. Feyeux M, Reignier A, Mocaer M, et al. Development of a robust automated tool for the annotation of embryo morphokinetic parameters. *BioRxiv* 2018 ; 445288.
39. Kieslinger DC, De Gheselle S, Lambalk CB, et al. Embryo selection using *time-lapse* analysis (Early Embryo Viability Assessment) in conjunction with standard morphology: a prospective two-center pilot study. *Hum Reprod* 2016 ; 31 : 2450-7.
40. Gouveia Nogueira MF, Bertogna Guilherme V, Pronunciate M, Dos Santos PH, Lima Bezerra da Silva D, Rocha JC. Artificial intelligence-based grading quality of bovine blastocyst digital images: direct capture with juxtaposed lenses of smartphone camera and stereomicroscope ocular lens. *Sensors* 2018 ; 18 : 35.
41. Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum Reprod Update* 2015 ; 21 : 727-47.
42. Dominguez F, Meseguer M, Aparicio-Ruiz B, Piqueras P, Quiñonero A, Simón C. New strategy for diagnosing embryo implantation potential by combining proteomics and *time-lapse* technologies. *Fertil Steril* 2015 ; 104 : 908-14.
43. Meseguer M, Kruhne U, Laursen S. Full in vitro fertilization laboratory mechanization: toward robotic assisted reproduction? *Fertil Steril* 2012 ; 97 : 1277-86.
44. Coticchio G, Mignini Renzini M, Novara PV, et al. Focused *time-lapse* analysis reveals novel aspects of human fertilization and suggests new parameters of embryo viability. *Hum Reprod* 2018 ; 33 : 23-31.
45. Belli M, Vigone G, Merico V, Redi CA, Garagna S, Zuccotti M. *Time-lapse* dynamics of the mouse oocyte chromatin organisation during meiotic resumption. *BioMed Res Int* 2014 ; 2014 : 207357.
46. Deglincerti A, Croft GF, Pietila LN, Zernicka-Goetz M, Siggia ED, Brivanlou AH. Self-organization of the *in vitro* attached human embryo. *Nature* 2016 ; 533 : 251-4.
47. Sanchez T, Wang T, Pedro MV, et al. Metabolic imaging with the use of fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) accurately detects mitochondrial dysfunction in mouse oocytes. *Fertil Steril* 2018 ; 110 : 1387-97.

## Problématique

Les paramètres utilisés actuellement pour le choix de l'embryon à transférer et/ou congeler ne permettent pas une sélection suffisamment spécifique de l'embryon avec le meilleur potentiel implantatoire. Malgré des résultats prometteurs, les nouvelles technologies comme le time-lapse n'offrent pas une amélioration franche de la sélection embryonnaire étant donné l'hétérogénéité des cohortes étudiées et la reproductibilité médiocre de l'annotation embryonnaire manuelle. Devant les limitations précédemment décrites sur l'utilisation des systèmes time-lapse il paraît important de chercher à optimiser son utilisation pour mieux choisir l'embryon avec le meilleur potentiel implantatoire.

3 questions majeures se posent :

1°) validité des modèles

Parmi les points soulevés par les détracteurs de l'utilisation clinique du time-lapse, la performance limitée des modèles prédictifs en dehors du centre où ils ont été développés est régulièrement citée (73). En effet, les rares études de validation externe ont rapporté des résultats inférieurs à ceux obtenus initialement (74,75).

2°) lien avec statut génétique de l'embryon / DPI-A ?

Ainsi avec l'émergence et la démocratisation du recours au DPI-A au niveau international, il est apparu nécessaire d'étudier s'il existait une corrélation entre la morphocinétique embryonnaire et le statut chromosomique embryonnaire de par l'absence d'autorisation pour la pratique du DPI-A en France. Une telle corrélation permettrait ainsi de s'affranchir du caractère invasif du DPI-A et de mieux choisir l'embryon à transférer.

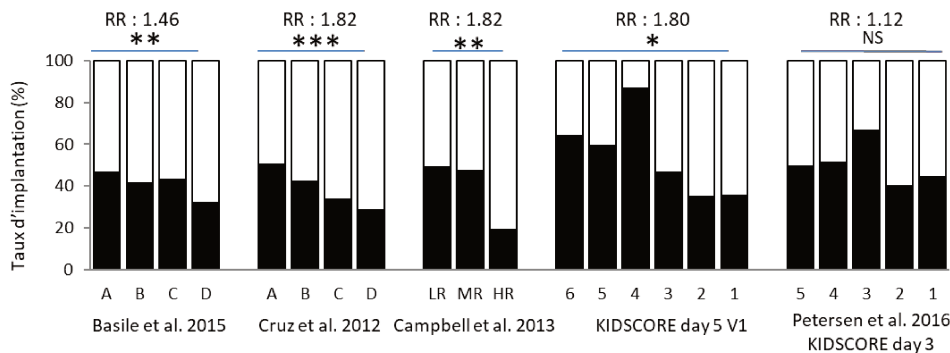
3°) variabilité de l'annotation de la morphocinétique / intérêt de l'automatisation

Une autre critique consistant en l'absence de modèle morphocinétique de sélection embryonnaire universel, notamment liée à l'existence d'une variabilité importante dans l'annotation manuelle du développement embryonnaire, l'automatisation de cette annotation morphocinétique semble être une piste non négligeable dans l'amélioration des performances de la technologie time lapse.

## Projet

Ce doctorat s'est appuyé sur les 3 problématiques citées précédemment :

1°) La première partie de ce projet s'est intéressée en l'étude des modèles prédictifs d'implantation embryonnaire disponibles. Nous avons étudié plusieurs modèles publiés dans la littérature (76–79) et les avons appliqués rétrospectivement à notre base de données morphocinétiques (figure 4) sans observer de caractère prédictif sur notre population. Ainsi pour chaque modèle, la catégorie correspondant au score le plus élevé a été comparée à la catégorie offrant le score le plus bas en termes de prédiction de l'implantation embryonnaire. Bien qu'une différence dans les taux d'implantation soit observée, les catégories avec le meilleur score embryonnaire ne sont pas corrélées avec des taux d'implantation particulièrement élevés, ce qui met en cause le caractère prédictif positif de ce type de scores sur l'obtention de la grossesse. La commercialisation ultérieure d'un modèle prédictif décrit comme utilisable peu importe la population ou le centre, le KIDScore Day5™, nous a conduit à tester ce modèle de façon rétrospective, évaluer son caractère prédictif de l'implantation embryonnaire et de naissance vivante et enfin sa concordance avec l'évaluation embryonnaire morphologique habituelle (article 2).



- Basile et al. (2015) : A (t3 = 34-40hpi et cc2 = 9-12h), B (t3 = 34-40hpi et cc2 <9h ou > 12h), C (t3 < 34 ou > 40hpi et cc2= 9-12h), D (t3 < 34 ou > 40hpi et cc2 <9h ou > 12h)  
 - Cruz et al (2012) : A (t5 = 48.8-56.6 hpi et S2 ≤ 0.76h), B (t5 < 48.8 ou > 56.6hpi et S2 ≤ 0.76h), C (t5 = 48.8-56.6 hpi et S2 > 0.76h), D (t5 < 48.8 ou > 56.6hpi et S2 > 0.76h)  
 - Campbell et al. (2013) : faible risque d'aneuploïdie (LR) (tSB < 96.2 hpi et tB < 122.9hpi), risque moyen d'aneuploïdie (MR) (tSB ≥ 96.2hpi et tB < 122.9hpi), risque élevé d'aneuploïdie (HR) ( tB ≥ 122.9hpi)

**Figure 4: Evaluation du caractère prédictif de plusieurs modèles publiés dans la littérature**

Le risque relatif est calculé entre le meilleur score et le moins bon

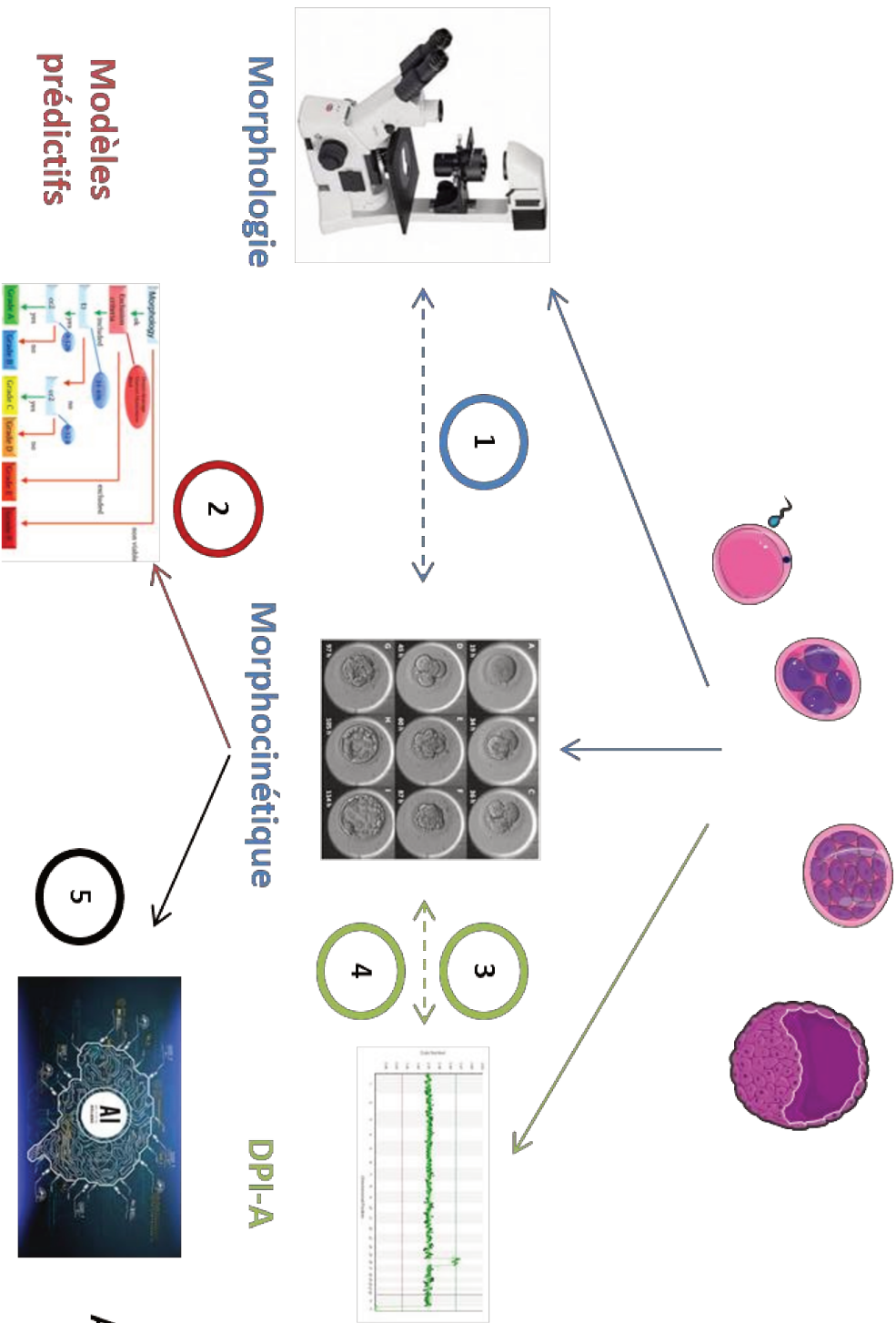
\* p < 0.01 ; \*\* p < 0.001 ; \*\*\* p < 0.0001 ; NS non significatif

2°) Devant la corrélation médiocre entre le score morphocinétique et les chances de grossesse, le projet s'est ensuite orienté vers l'étude d'une possible corrélation entre les paramètres de la morphocinétique embryonnaire et le statut chromosomique d'un embryon, que ce soit le statut de ploïdie ou la détection de déséquilibre de la formule chromosomique pour les embryons biopsiés dans le cadre des indications chromosomiques de DPI.

Ainsi, une première étape a consisté en la réalisation d'une revue exhaustive de la littérature sur le lien entre morphocinétique embryonnaire et ploïdie (article 3). Nous nous sommes ensuite intéressés aux résultats de la morphocinétique embryonnaire pour les embryons biopsiés dans notre centre au cours d'une prise en charge en DPI pour indication chromosomique, n'ayant pas la possibilité d'avoir accès à des données de DPI-A, et avons cherché à établir une corrélation entre ces résultats et le statut chromosomique de ces embryons (article 4).

3°) Au regard de l'absence de marqueur morphocinétique franchement prédictif de grossesse ou du statut chromosomique embryonnaire, une des hypothèses explicatives réside dans l'absence d'étude avec des effectifs suffisants et l'hétérogénéité des populations étudiées et de l'annotation manuelle. La dernière étape du projet de thèse s'est alors attachée au développement d'un outil d'annotation automatisée de la morphocinétique embryonnaire, basé sur une analyse d'images à partir de vidéos extraites de l'Embryoscope® après réannotation manuelle exhaustive, permettant à l'avenir l'annotation rapide et fiable de larges cohortes multicentriques (article 5).

Figure 5: Figure 5 : Résumé graphique de la thèse et publications associées



**Articles**

1. **Reignier, A** et al. Le time-lapse : bilan et perspectives en 2019. *Médecine de la Reproduction*. 9 mai 2019
2. **Reignier, A** et al. Performance of Day 5 KIDScore™ morphokinetic prediction models of implantation and live birth after single blastocyst transfer. *J Assist Reprod Genet.* nov 2019;36(11):2279-85
3. **Reignier, A** et al. Can time-lapse parameters predict embryo ploidy? A systematic review. *Reprod Biomed Online.* avr 2018;36(4):380-7.
4. **Lammers, J, Reignier, A** et al. Morphokinetic parameters in chromosomal translocation carriers undergoing preimplantation genetic testing. *Reprod Biomed Online.* Février 2019 ;38(2):177-183
5. **Feyeux, M\*, Reignier, A\*** et al. Development of automated annotation software for human embryo morphokinetics. *Hum Reprod.* 27 mars 2020;35(3):557-64.\***co-1st authors**

**Automatisation**

## A] Evaluation des modèles prédictifs

### Article 2

#### **Performance of Day 5 KIDScore™ morphokinetic prediction models of implantation and live birth after single blastocyst transfer**

Résumé détaillé en Français

**But :** Alors que plusieurs études ont reporté l'association entre les paramètres morphocinétiques et l'implantation embryonnaire, peu de modèles prédictifs d'implantation ont été développés pour le transfert au stade blastocyste, et cela sans validation externe. L'objectif de cette étude était d'évaluer la performance respective de deux modèles morphocinétiques commerciaux disponibles KIDScore™ Day 5 versions 1 and 2) pour la prédiction de naissance vivante après transfert d'un blastocyste unique au cinquième jour de développement

**Méthodes :** Cette étude monocentrique rétrospective a été réalisée sur 210 cycles d'ICSI avec un transfert d'embryon unique au 5<sup>ème</sup> jour après culture dans un système Time-Lapse entre 2013 et 2016. La corrélation entre les deux versions du KIDScore™ et les taux d'implantation et de naissance vivante observés a été calculée, tout comme la concordance avec la décision médicale pour le transfert et la classification des embryons.

**Résultats :** Les taux d'implantation et de naissance vivante étaient tous deux de 35,7%. Une corrélation positivement significative a été observée entre les deux modèles et les taux d'implantation ( $r = 0,96$  and  $r = 0,90$ ,  $p = 0,01$ ). Les deux modèles avaient un pouvoir prédictif statistiquement significatif mais limité pour la prédiction de l'implantation (AUC 0,60). Il existait une bonne concordance pour le choix de l'embryon à transférer entre l'embryologiste et les deux modèles (78% et 61% respectivement).

**Conclusions** Les deux versions du modèle prédictif KIDScore™ Day 5 sont corrélées avec les taux d'implantation après transfert d'un blastocyste unique au 5<sup>ème</sup> jour de développement. Cependant leur performance prédictive reste perfectible. L'utilisation de ces modèles permet une aide pour le choix de l'embryon à transférer par

l'embryologiste, favorisant ainsi l'implémentation d'une politique de transfert de blastocyste unique. Malgré cela, l'expertise humaine dans la décision de l'embryon pour le transfert reste nécessaire.



# Performance of Day 5 KIDScore™ morphokinetic prediction models of implantation and live birth after single blastocyst transfer

Arnaud Reignier<sup>1,2,3</sup> · Jean-Maxime Girard<sup>4</sup> · Jenna Lammers<sup>1</sup> · Sana Chtourou<sup>1,5</sup> · Tiphaine Lefebvre<sup>1,3</sup> · Paul Barriere<sup>1,2,3</sup> · Thomas Freour<sup>1,2,3</sup>

Received: 15 April 2019 / Accepted: 15 August 2019  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

## Abstract

**Purpose** While several studies reported the association between morphokinetic parameters and implantation, few predictive models were developed to predict implantation after day 5 embryo transfer, generally without external validation. The objective of this study was to evaluate the respective performance of 2 commercially available morphokinetic-based models (KIDScore™ Day 5 versions 1 and 2) for the prediction of implantation and live birth after day 5 single blastocyst transfer.

**Methods** This monocentric retrospective study was conducted on 210 ICSI cycles with single day 5 embryo transfer performed with a time-lapse imaging (TLI) system between 2013 and 2016. The association between both KIDScore™ and the observed implantation and live birth rates was calculated, as well as the agreement between embryologist's choice for transfer and embryo ranking by the models.

**Results** Implantation and live birth rate were both 35.7%. A significant positive correlation was found between both models and implantation rate ( $r=0.96$  and  $r=0.90$ ,  $p=0.01$ ) respectively. Both models had statistically significant but limited predictive power for implantation (AUC 0.60). There was a fair agreement between the embryologists' choice and both models (78% and 61% respectively), with minor differences in case of discrepancies.

**Conclusions** KIDScore™ Day 5 predictive models are significantly associated with implantation rates after day 5 single blastocyst transfer. However, their predictive performance remains perfectible. The use of these predictive models holds promises as decision-making tools to help the embryologist select the best embryo, ultimately facilitating the implementation of SET policy. However, embryologists' expertise remains absolutely necessary to make the final decision.

**Keywords** IVF · Blastocyst · Time-lapse · Prediction model · Implantation

---

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10815-019-01567-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

---

✉ Thomas Freour  
thomas.freour@chu-nantes.fr

<sup>1</sup> Service de biologie et médecine de la reproduction, CHU Nantes, 38 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes, France

<sup>2</sup> Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>3</sup> Faculté de médecine, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>4</sup> Centre d'AMP Procréalis, La Roche-sur-Yon, France

<sup>5</sup> Laboratoire de biologie de la reproduction et de cytogénétique, Hôpital Aziza Othmana, Tunis, Tunisia

## Introduction

Despite the large number of morphological evaluations of embryo quality described in the literature in order to select the embryos with the highest implantation potential for transfer or freezing [1, 2], the discriminating power of these evaluations for implantation remains moderate, both for the early stage and for the blastocyst stage [3]. In addition, embryo morphology assessment suffers from a significant inter-individual variability [4].

The implementation of time-lapse technology in clinical embryology in the late 2000s brought new insights into embryo development and embryo quality assessment, without compromising embryo culture conditions [5]. Although its clinical value is still debated by some in the literature [6], the shift from daily static observation to dynamic and continuous embryo monitoring in undisturbed culture conditions led



to improved clinical outcome in many studies. These promising results were emphasized in a recently updated meta-analysis conducted in randomized controlled trials, which concluded that time-lapse leads to improved clinical outcome compared with classical morphological embryo evaluation [7, 8]. However, this was challenged in another recent meta-analysis leading to contradictory results [9, 10].

Given the large amount of data generated for each embryo, several predictive models for implantation based on morphokinetic parameters have been developed to facilitate, standardize, and improve embryo selection. Since the first model reported by Meseguer in 2011 [11], many others have been presented with various aims, *i.e.*, to detect the risks of aneuploidy [12, 13], to predict blastocyst formation [14, 15], or implantation [16–18]. However, most of these algorithms (except in [17, 18]) are based on relatively little data (98 to 754 embryos) and few have been tested in a randomized prospective study [18–20], or validated in other ART centers [21–23]. The heterogeneous inclusion criteria (age, number of oocytes, oocyte origin) as well as the differences in patients' characteristics and laboratory settings and culture conditions including use of reduced oxygen between IVF centers limit the generalizability of these models [23–26], highlighting the need for huge multicentric dataset in almost unselected population in order to build a robust inter-laboratory model.

The KIDScore™ Day 5 (version 1 and version 2) is a predictive model for implantation after embryo transfer on day 5, developed for Embryoscope™ devices and based on very large multicentric datasets. It assigns a score that increases with the embryo's potential for implantation, and aims at ranking embryos from the same cohort in order to select the one with the highest implantation potential for transfer. In the first version (v1), it is based on 3 morphological parameters (normal ploidy status of the zygote (2PN) on day 1 and blastocyst morphology (ICM and TE) on day 5) and 8 morphokinetic parameters (tPNf, t2, t3, t4, t5, t8, tSB, tB), with hierarchical analysis assigning a categorical score between 0 and 6. Input was reduced to 5 morphokinetic and 2 morphology parameters in the second version (v2) based on regression analysis, assigning a linear score between 0 and 9.9. The mathematical details of these day 5 algorithms are protected by copyright and have not been published yet, and their respective performance in clinical setting has not been reported up to now.

The main objective of this work was to evaluate the clinical value of these 2 commercial morphokinetic predictive models for the prediction of embryo implantation after day 5 transfer.

## Materials and methods

This monocentric retrospective study was conducted on all intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles followed by

day 5 single blastocyst transfer (SBT) performed with the Embryoscope® between January 2013 when single blastocyst transfer policy was implemented and December 2016 when we started using KIDScore™. This allowed us to have all data available on subsequent live birth. There were no clinical or biological inclusion criteria, except the use of ICSI. Egg donation cycles and PGD cycles, as well as double blastocyst transfer cycles, were excluded. As time-lapse cannot be offered to all patients in our setting yet, this technology is randomly assigned to all ICSI couples whenever space is available in the device, independently of any clinical or biological characteristics.

All patients were stimulated using a controlled ovarian stimulation protocol with antagonist protocol. When at least 3 follicles > 17 mm were observed on ultrasound, ovulation was triggered by a single administration of rHCG (Ovitrelle®, Merck Serono®). Oocyte retrieval was performed 36 h later. The cumulus oocyte complexes collected were denuded with hyaluronidase (SynVtro Hyadase®, Origio®). Only mature oocytes were retained for microinjection and subsequently inserted into the Embryoscope® and grown up to the blastocyst stage in sequential culture media (G1-G2 media®, Vitrolife®) under controlled atmosphere (6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>) with image acquisition every 10 min. Embryos' morphokinetic parameters were annotated individually according to published guidelines [2, 27], but not used for embryo choice at blastocyst stage. According to the strategy of our center, embryos with abnormal cleavages during first cell cycle, *i.e.*, reverse cleavage or direct cleavage from zygote to ≥ 3 daughter cells, were systematically discarded on day 2. On day 5, blastocysts were selected for transfer according to Gardner's criteria. Blastocysts ≥ B1 were transferred, with the exception of those with a grade C trophoctoderm. Blastocyst morphological quality was graded as follows. Blastocysts ≥ B3 expansion and grade A trophoctoderm were classified as top quality, blastocysts < B3 and/or blastocysts with grade B trophoctoderm were classified as medium-quality blastocysts, B1 and B2 blastocysts with apparent poor morphology but with trophoctoderm that could not be evaluated precisely were classified as poor quality. Embryologist's choice was mainly based on these conventional day 5 morphological criteria, apart from abnormal cleavage cited above.

KIDScore™ Day 5 v1 and v2 were retrospectively applied on all blastocysts transferred on day 5. The correlation between KIDScore™ day 5 (v1 and v2) and observed implantation rate was then calculated (with KIDScore™ Day 5 v2 presented as quartiles instead of a continuous variable). ROC curve analysis with implantation as main endpoint was also performed.

Pregnancy test was carried out 11 or 12 days after embryo transfer and was repeated every 48 h until reaching the threshold of 1000 IU/L. Clinical pregnancies were confirmed by ultrasound 4 to 5 weeks later, demonstrating gestational sacs

and cardiac activity. Implantation rate was defined as the number of gestational sac with cardiac fetal activity over the number of embryos transferred. Live birth rate was defined as the number of deliveries that resulted in a live-born neonate, expressed per 100 embryo transfers.

### Ethical approval

All study parameters were extracted from our local database, which is regulated by a French national agency (the CNIL). All patients gave their informed consent for the anonymous use of the database for research purpose. This protocol was approved by local ethics committee (GNEDS).

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism and MedCalc software. Chi-square was used to compare proportions. ROC curve analysis was performed to evaluate the predictive performance of both models for implantation. Linear regression was used to measure the association between KIDScore™ and implantation. Multiple logistic regression was performed to assess the respective association between both KIDScore™, female age, conventional embryo morphology (i.e., blastocyst expansion rate according to Gardner's criteria and overall blastocyst morphological quality) and implantation. A  $p$  value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

### Results

We included 210 cycles leading to single blastocyst transfers in 210 couples. All couples were referred for ICSI because of male infertility factor, and received single blastocyst transfer on day 5. KIDScore™ Day 5 v1 and v2 were retrospectively applied on each blastocyst in order to evaluate their respective predictive value for implantation. Implantation occurred in 75 out of 210 cycles (implantation rate 35.7%). All clinical pregnancies ended up with live birth ( $n = 75$ , live birth rate 37.5%). Demographic characteristics, ovarian stimulation parameters, and embryo development are presented in Table 1. Mean KIDScore™ Day 5 v1 and blastocyst expansion rate were significantly different between implantation and non-implantation groups. The association between KIDScore™ Day 5 v1 and embryo implantation percentages is shown in Fig. 1a. A strong positive correlation between KIDScore™ Day 5 v1 and implantation rate was observed ( $r = 0.96$ ,  $p = 0.001$ ). A strong positive correlation between KIDScore™ Day 5 v2 and implantation rate was also observed ( $r = 0.90$ ,  $p = 0.01$ ) (Fig. 1b). ROC curve analysis was performed for both models and demonstrated that both models were significant predictors of implantation, with respective area under

curves of 0.59 ([IC 95 0.52–0.66];  $p = 0.02$ ) and 0.60 (IC 95 0.51–0.67;  $p = 0.005$ ) for KIDScore™ Day 5 v1 and v2 (Fig. 2). ROC curve analysis was also performed, blastocyst expansion rate (AUC 0.60, [IC 95 0.52–0.67];  $p = 0.018$ ) and blastocyst morphology score (AUC 0.61, [IC 95 0.54–0.69];  $p = 0.004$ ) (Supplementary Figure 1). Multiple logistic regression including female age, blastocyst morphology score, and KIDScore™ v1 and v2 showed that no variable was independently associated with clinical outcome.

Finally, we studied the concordance between the embryo chosen for transfer by the embryologist based on blastocyst morphology but not morphokinetic parameters (except direct cleavage), and the embryo retrospectively identified by KIDScore™ Day 5 v1 and v2 as having the highest implantation potential. This analysis was restricted to cycles where at least 2 blastocysts were eligible for transfer on day 5 ( $n = 114$ ). Implantation occurred in 47 cycles in this subgroup (41.2%). The agreement between embryologist's choice and KIDScore™ day 5 v1 was 78% ( $n = 89$ , concordant group). Among the 25 cases of discordance for KIDScore™ day 5 v1, the majority ( $n = 14$ , 56%) had a score difference of 1, meaning that an embryo ranked 5 by the KIDScore™ Day 5 v1 was selected for transfer by the embryologist, whereas an embryo having a score of 6 was available. However, these 25 blastocysts not used for fresh transfer were systematically frozen anyway. The implantation rate was 41.6% in the concordant group ( $n = 37/89$ ) and 40% in the discordant group ( $n = 10/25$ ) ( $p > 0.05$ ). The agreement between embryologist's choice and KIDScore™ Day 5 v2 was slightly lower ( $n = 70$ , 61.4%, concordant group) than with KIDScore™ Day 5 v1. However, KIDScore™ Day 5 v2 has a more detailed score, as it is continuous and not a categorical variable, and the mean score difference between the embryo selected for transfer and the one with the highest score was 0.37 on average (range 0.1–2.8). Among the 44 discordant classifications, the difference between the score of the embryo selected for transfer by the embryologist and the one retrospectively identified with the highest score by the model was less than 1 in 33 cases (75%). Once again, the 44 blastocysts with a higher score not initially chosen by the embryologist for fresh transfer were systematically frozen anyway. The implantation rate was 41.4% in the concordant group ( $n = 29/70$ ) and 40.9% in this discordant group ( $n = 18/44$ ) ( $p > 0.05$ ).

### Discussion

In this study, we demonstrated that both KIDScore™ Day 5 v1 and v2 were significantly associated with the chances of implantation and live birth after day 5 single blastocyst transfer, however, with perfectible performance.

Blastocyst is the ultimate developmental stage before implantation, occurring after embryo genome activation and

**Table 1** Demographic characteristics, ovarian stimulation parameters, and embryo development in implantation and non-implantation groups. All cycles were performed by ovarian stimulation with antagonist protocol, followed by ICSI because of male factor and single blastocyst transfer on day 5. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation or proportion when appropriate

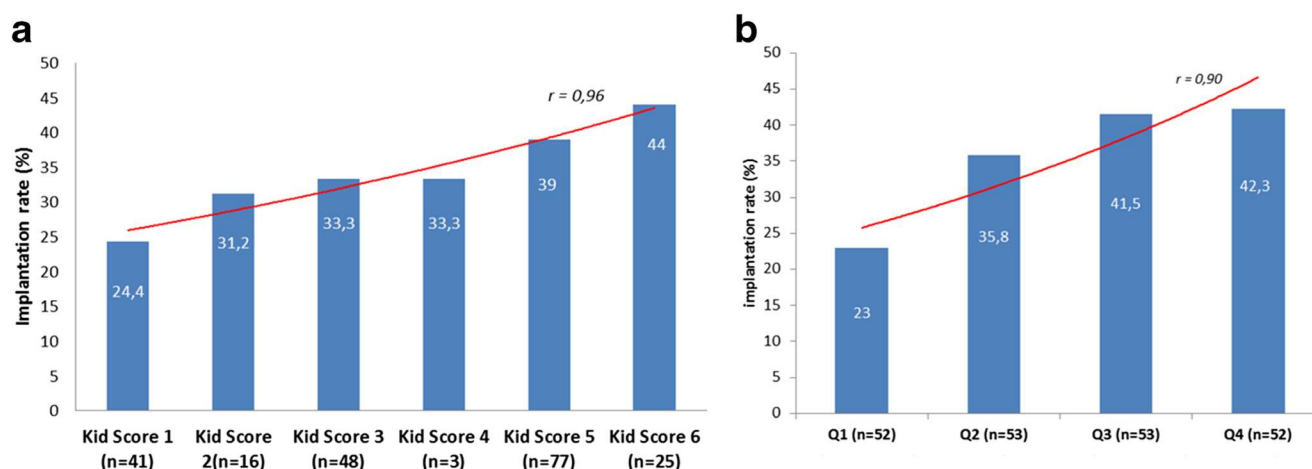
		Implantation ( <i>n</i> = 73)	No implantation ( <i>n</i> = 137)
Demographic characteristics	Female age (years)	31.92 $\pm$ 4.38	32.67 $\pm$ 4.65
	Male age (years)	35.97 $\pm$ 7.55	36.04 $\pm$ 6.36
	Infertility duration (years)	3.45 $\pm$ 2.12	3.44 $\pm$ 2.10
	AMH ( $\mu$ g/L)	4.01 $\pm$ 0.56	3.51 $\pm$ 2.78
Ovarian stimulation parameters	Initial daily dose of gonadotropin (U)	233 $\pm$ 89	246 $\pm$ 115
	Total amount of gonadotropins (U)	2313 $\pm$ 929.20	2517 $\pm$ 1106
	Number of mature oocytes retrieved	9.7 $\pm$ 4	8.5 $\pm$ 3.5
Embryo development	Fertilization rate (%)	58.94%	57.24%
	Blastulation rate (blastocyst per 2PN)	68.3%	68.32%
	Blastocyst expansion rate at the time of transfer <sup>§</sup>	3.29 $\pm$ 1.06	2.87 $\pm$ 1.22*
	KIDScore Day 5 v1	4 $\pm$ 1.67	3.43 $\pm$ 1.74*
	KIDScore Day 5 v2	6.94 $\pm$ 1.76	6.38 $\pm$ 2.09

\* $p < 0.05$ . <sup>§</sup> Grading of blastocyst expansion according to Gardner's criteria

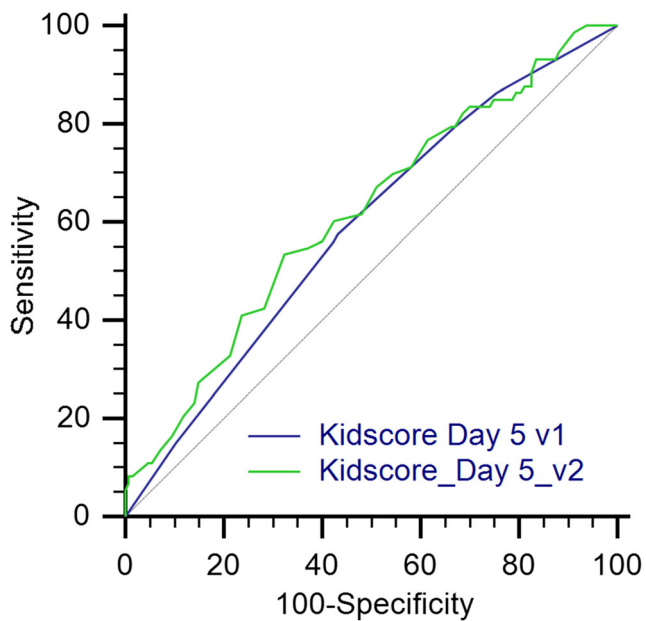
cellular lineage specification. The positive association between blastocyst morphological criteria [3] and/or late morphokinetic criteria [3, 28] and implantation chances has been extensively demonstrated. However, blastocyst implantation rate is far from 100%. Moreover, blastocyst morphological assessment remains slightly subjective and ranking several blastocysts can be difficult in routine practice. In this respect, algorithms combining early morphokinetic and late morphological criteria could be a promising approach to improve embryo quality assessment on day 5 before transfer. To our knowledge, this study is the first to evaluate the clinical value of KIDScore™ Day 5 (v1 and v2) for the prediction of implantation after day 5 embryo transfer. Although we found a good correlation between the KIDScore™ Day 5 and implantation rates, and a statistically significant predicting capability of both models for implantation and live birth, the area under curve obtained for both models was moderate and perfectible. These results are quite close to those recently reported for

several day 3 algorithms, including KIDScore™ Day 3 [29]. Although ROC analysis is common and appropriate when evaluating a prognostic factor such as KIDScore™, its results should be interpreted with care. Indeed, KIDScore™ aims at ranking embryos within a cohort rather than finding their individual implantation potential. Moreover, the outcomes considered here are implantation and live birth, which are by definition multifactorial, depending not only on embryo quality, but also on several clinical factors.

We also retrospectively studied the concordance between KIDScore™ indication and embryologist's choice in order to evaluate to which extent the model would help the embryologist to objectively rank embryos and prioritize the one with the highest implantation potential. We found that the embryologist's choice was in agreement with the prediction model in most cases (78% and 61% for v1 and v2). It should be recalled here that only blastocyst morphology but not morphokinetic parameters (except direct and revers cleavages) were not used



**Fig. 1** Association between KIDScore™ Day 5 version 1 (a) or version 2 (b) and embryo implantation rates (linear regression,  $n = 210$ )



**Fig. 2** Receiver operating characteristic (ROC) curve comparing KIDScore™ Day 5 version 1 and version 2 for the prediction of implantation ( $n = 210$ )

for selecting blastocysts for transfer. However, both trophectoderm morphology and direct cleavages are part of KIDScore™ and constitute thus some kind of overlap between both selection strategies. Although KIDScore™ Day 5 was not tested, such a relatively high agreement between algorithms and embryologists' choice was reported in an interesting recent comparative study [30]. Of interest, we observed that the gap between the model and embryologist's choice was always very limited, with the embryologist choosing the embryo with the second highest score for transfer and freezing the one with the highest score. Implantation/live birth rates were not statistically different between concordant and discordant groups, but the numbers in each group were limited. However, and owing to the positive association found between KIDScore™ Day 5 and implantation/live birth rate, it could be eventually postulated that the use of these predictive models would have led to a slightly higher implantation/live birth rate after fresh blastocyst transfer. This hypothesis obviously remains to be tested in properly designed prospective studies with appropriate power calculation. In any case, KIDScore™ might be considered as an "objective" second opinion on embryo ranking, helping embryologists to make their clinical decision more objectively. This could prove specifically useful for new or less experienced embryologists and in large staffs as a way to standardize or homogenize procedures. KIDScore™ Day 5 is directly available in the annotation software, does not need to be validated before clinical use, and gives add-on information helping the embryologist to evaluate embryo quality.

One strength of our study lies within the use of a single embryo transfer dataset instead of the known implantation

dataset (KID), avoiding the inherent confounding factors associated with double embryo transfers [29]. Furthermore, the availability of live birth data reinforces the clinical relevance of this work, even though KIDScore™ has been initially designed as a predictor of implantation and not live birth. Third, our study was conducted in an almost unselected ICSI population, making it theoretically be generalizable in other centers. However, we acknowledge that this statement should be nuanced. Indeed, not all patients are offered time-lapse and undergo single blastocyst transfer in our center. Moreover, our population is quite young, therefore questioning the robustness of our results in other settings, as female age could be considered as a confounding factor [29]. Another limitation lies within statistical robustness of our analysis. Indeed, no study reported the performance of these day 5 prediction models and concordance with embryologist's selection up to now, preventing from formulating relevant hypothesis and hence from performing an a priori power calculation. However, this retrospective cohort study might serve as a basis for further prospective trials. The issue of culture conditions should be addressed as well when considering the generalizability of a prediction model [31]. Although we acknowledge that our results should not be applied to IVF labs performing blastocyst culture in ambient oxygen atmosphere, the unquestionable evidence that blastocyst culture should be performed under reduced oxygen level [32] nuances this limitation. Finally, although some consensus guidelines have been proposed, one of the limitations of predictive models based on morphokinetic parameters lies within the lack of standardization of the starting point of image analysis and annotations [27, 33]. Most studies, including ours, use the middle time point of the whole ICSI procedure for the cohort as  $t_0$ . We acknowledge that alternative starting point should be considered in the future, such as pronuclear fading, in order to minimize bias, although the impact of an eventual 10-min delay on the KIDScore™ result and subsequent clinical decision might be insignificant.

One obvious limitation of this study lies within its retrospective design. A prospective randomized study is obviously needed to confirm the clinical relevance of KIDScore™. Although there is no evidence in the literature that male factor is associated with specific morphokinetic pattern [34], we also acknowledge that our results only reflect cycles performed in male factor cases, and should therefore not be generalized to the whole infertile population. Furthermore, the very limited number of cycles performed with extremely severe oligospermia or surgically retrieved sperm did not allow relevant statistical subgroup analysis.

The issue of independent confounding factors, such as age, when building morphokinetic predictive models has been recently raised [29, 35]. Blastocyst morphology is significantly associated with implantation and should be considered as a confounder [29]. Trophectoderm grade is one of the variables

included in KIDScore™ Day 5 models. Predictive models based on large multicentric databases including various types of patients might partly overcome this risk of bias. In this respect, and as a perspective, these results might advocate for the development of fully automated annotation tool and deep learning approaches. Indeed, automated detection of cell cleavages could help lower inter-operator variability, improving lab workflow, and ultimately allow large multicentric database analysis. Thereby, a recent prediction model based on machine learning analysis of embryo development has been published and describes a random forest model able to predict implantation potential of a transferred embryo with a high AUC of 0.74 [36]. Moreover, a very promising and fully automated deep learning model, validated in 8 clinics, has just been described [37]. This model appears to be able to predict fetal heart pregnancy with an extremely high AUC of 0.93 [37].

## Conclusion

KIDScore™ Day 5 morphokinetic-based predictive models are significantly associated with implantation and live birth rates after day 5 single blastocyst transfer. However, their predictive performance remains perfectible. Although this needs to be further confirmed in large prospective randomized studies in order to evaluate their real clinical added value, the use of these predictive models hold promises as decision-making tools to help the embryologist select the best strategy for embryo culture and the best embryo for transfer. It can be postulated that the association of time-lapse and morphokinetic decision support algorithms might lead to facilitated implementation of SET policy. Even if partial automation might be a desirable goal in IVF labs, embryologists' expertise is still absolutely necessary to have a global view of embryo development and make the final decision about embryo fate.

## Compliance with ethical standards

All patients gave their informed consent for the anonymous use of the database for research purpose. This protocol was approved by local ethics committee (GNEDS).

## References

1. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod*. 1999;14:1318–23.
2. Alpha Scientists in Reproductive M, Embryology ESIGo. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*. 2011;26:1270–83.
3. Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum Reprod Update*. 2015;21:727–47.
4. Paternot G, Wetzels AM, Thonon F, Vansteenbrugge A, Willemen D, Devroe J, et al. Intra- and interobserver analysis in the morphological assessment of early stage embryos during an ivf procedure: a multicentre study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:127.
5. Basile N, Caiazzo M, Meseguer M. What does morphokinetics add to embryo selection and in-vitro fertilization outcomes? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2015;27:193–200.
6. Paulson RJ, Reichman DE, Zaninovic N, Goodman LR, Racowsky C. Time-lapse imaging: clearly useful to both laboratory personnel and patient outcomes versus just because we can doesn't mean we should. *Fertil Steril*. 2018;109:584–91.
7. Pribenszky C, Nilselid AM, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reprod BioMed Online*. 2017;35:511–20.
8. Pribenszky C, Nilselid AM, Montag M. Response: time-lapse systems for ART. *Reprod BioMed Online*. 2018;36:290–2.
9. Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Farquhar C. Time-lapse systems for ART. *Reprod BioMed Online*. 2018;36:288–9.
10. Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018b;5:CD011320.
11. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*. 2011;26:2658–71.
12. Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CF. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod BioMed Online*. 2013;26:477–85.
13. Basile N, Nogales Mdel C, Bronet F, Florensa M, Riqueiros M, Rodrigo L, et al. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil Steril*. 2014;101:699–704.
14. Milewski R, Kuc P, Kuczynska A, Stankiewicz B, Lukaszuk K, Kuczynski W. A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32:571–9.
15. Motato Y, de los Santos MJ, Escriba MJ, Ruiz BA, Remohi J, Meseguer M. Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system. *Fertil Steril*. 2016;105:376–84.
16. Liu Y, Chapple V, Feenan K, Roberts P, Matson P. Time-lapse deselection model for human day 3 in vitro fertilization embryos: the combination of qualitative and quantitative measures of embryo growth. *Fertil Steril*. 2016;105:656–62.
17. Petersen BM, Boel M, Montag M, Gardner DK. Development of a generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on day 3. *Hum Reprod*. 2016;31:2231–44.
18. Yang L, Cai S, Zhang S, Kong X, Gu Y, Lu C, et al. Single embryo transfer by day 3 time-lapse selection versus day 5 conventional morphological selection: a randomized, open-label, non-inferiority trial. *Hum Reprod*. 2018;33:869–76.
19. Rubio I, Galan 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. *Fertil Steril*. 2014;102:1287–94.
20. Adamson GD, Abusief ME, Palao L, Witmer J, Palao LM, Gvakharia M. Improved implantation rates of day 3 embryo transfers with the use of an automated time-lapse-enabled test to aid in embryo selection. *Fertil Steril*. 2016;105:369–75.
21. VerMilyea MD, Tan L, Anthony JT, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, et al. Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: a blinded, multi-centre study. *Reprod BioMed Online*. 2014;29:729–36.

22. Kirkegaard K, Campbell A, Agerholm I, Bentin-Ley U, Gabrielsen A, Kirk J, et al. Limitations of a time-lapse blastocyst prediction model: a large multicentre outcome analysis. *Reprod BioMed Online*. 2014;29:156–8.
23. Freour T, Le Fleuter N, Lammers J, Splingart C, Reignier A, Barriere P. External validation of a time-lapse prediction model. *Fertil Steril*. 2015b;103:917–22.
24. 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.
25. Hardarson T, Bungum M, Conaghan J, Meintjes M, Chantilis SJ, Molnar L, et al. Noninferiority, randomized, controlled trial comparing embryo development using media developed for sequential or undisturbed culture in a time-lapse setup. *Fertil Steril*. 2015;104:1452–9.
26. Barrie A, Homburg R, McDowell G, Brown J, Kingsland C, Troup S. Examining the efficacy of six published time-lapse imaging embryo selection algorithms to predict implantation to demonstrate the need for the development of specific, in-house morphokinetic selection algorithms. *Fertil Steril*. 2017;107:613–21.
27. Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, Aguilar J, Chamayou S, Esbert M, et al. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum Reprod*. 2014;29:2650–60.
28. Zaninovic N, Irani M, Meseguer M. Assessment of embryo morphology and developmental dynamics by time-lapse microscopy: is there a relation to implantation and ploidy? *Fertil Steril*. 2017;108:722–9.
29. Liu Y, Feenan K, Chapple V, Matson P. Assessing efficacy of day 3 embryo time-lapse algorithms retrospectively: impacts of dataset type and confounding factors. *Hum Fertil (Camb)*. 2019;22:182–90.
30. Storr A, Venetis C, Cooke S, Kilani S, Ledger W. Time-lapse algorithms and morphological selection of day-5 embryos for transfer: a preclinical validation study. *Fertil Steril*. 2018;109:276–83.
31. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil Steril*. 2013;99:738–44.
32. 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*. 2016;22:2–22.
33. Liu Y, Chapple V, Feenan K, Roberts P, Matson P. Time-lapse videography of human embryos: using pronuclear fading rather than insemination in ivf and icisi cycles removes inconsistencies in time to reach early cleavage milestones. *Reprod Biol*. 2015;15:122–5.
34. Lammers J, Reignier A, Splingart C, Catteau A, David L, Barriere P, et al. Does sperm origin affect embryo morphokinetic parameters? *J Assist Reprod Genet*. 2015;32:1325–32.
35. Kirkegaard K, Sundvall L, Erlandsen M, Hindkjaer JJ, Knudsen UB, Ingerslev HJ. Timing of human preimplantation embryonic development is confounded by embryo origin. *Hum Reprod*. 2016;31:324–31.
36. Blank C, Wildeboer RR, DeCroc I, Tilleman K, Weyers B, de Sutter P, et al. Prediction of implantation after blastocyst transfer in in vitro fertilization: a machine-learning perspective. *Fertil Steril*. 2019;111:318–26.
37. Tran D, Cooke S, Illingworth PJ, Gardner DK. Deep learning as a predictive tool for fetal heart pregnancy following time-lapse incubation and blastocyst transfer. *Hum Reprod*. 2019;34:1011–8.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Cette étude, complémentaire avec les travaux précédents de l'équipe (74) illustre les limites actuelles des modèles prédictifs et la difficulté à mettre en évidence des paramètres de qualité embryonnaire universellement utilisables de par l'hétérogénéité des cohortes étudiées et les variations dans les données analysées.

## **B] Etude de l'association entre paramètres morphocinétiques et ploïdie embryonnaire**

Alors que la morphocinétique embryonnaire semble être associée au potentiel implantatoire, il est également décrit l'existence d'une forte association entre le statut chromosomique de l'embryon et ses chances de succès dans la grossesse. Ce postulat est à l'origine de l'engouement observé pour le DPI-A et sa démocratisation à l'international. Cependant, en l'absence d'accès à cette technologie en France et devant notre volonté de développer au maximum le recours aux techniques non invasives d'évaluation de la qualité embryonnaire, il nous est paru important de s'intéresser au lien pouvant exister entre la formule chromosomique embryonnaire et la cinétique de développement. Nous avons alors procédé à une revue systématique de la littérature afin de déterminer si la morphocinétique embryonnaire pouvait être prédictive de la ploïdie embryonnaire.



## Article 3

### Can time-lapse parameters predict embryo ploidy? A systematic review

Résumé détaillé en Français

L'évaluation de la morphologie embryonnaire présente un faible pouvoir prédictif d'implantation. Le diagnostic pré-implantatoire d'aneuploïdie (DPI-A) s'est amélioré mais sa plus-value clinique est toujours débattue et le développement d'une méthode non-invasive et peu coûteuse de détermination du statut chromosomique embryonnaire est à privilégier. La démocratisation de l'utilisation des systèmes time-lapse a amené des équipes à tester l'efficacité de la morphocinétique embryonnaire comme paramètre prédictif de la ploïdie embryonnaire, avec des résultats mitigés. Le but de cette étude a été de réaliser une revue intégrale de la littérature sur le pouvoir prédictif de la morphocinétique embryonnaire sur le statut de ploïdie embryonnaire. Une recherche systématique a été effectuée sur la base PUBMED avec les mots clés suivants : time-lapse, morphokinetics, aneuploidy, IVF, preimplantation genetic screening, PGS, chromosomal status. Un total de 13 études a été inclus à l'analyse. Leur design était hétérogène, tout comme les caractéristiques des patients, le jour de biopsie embryonnaire, les approches statistiques et le critère majeur d'analyse. Aucun paramètre morphocinétique unique ou combiné n'a pu être identifié comme marqueur prédictif de la ploïdie embryonnaire. En conclusion, les études disponibles sont trop hétérogènes pour conclure sur la valeur de l'analyse des paramètres morphocinétiques dans l'évaluation de la ploïdie embryonnaire. Ainsi, la morphocinétique embryonnaire ne devrait pas être utilisée à la place du DPI-A pour déterminer le statut chromosomique embryonnaire.



## Review

# Can time-lapse parameters predict embryo ploidy? A systematic review



**Arnaud Reignier**<sup>a,b,c</sup>, **Jenna Lammers**<sup>a,b</sup>, **Paul Barriere**<sup>a,b,c</sup>,  
**Thomas Freour**<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Service de Médecine et Biologie du Développement et de la Reproduction, CHU de Nantes, 38 boulevard Jean Monnet, Nantes, France

<sup>b</sup> Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>c</sup> Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France



Thomas Freour, PharmD, PhD, is the head of the ART Center at the University Hospital of Nantes, France. He is also a member of the UMR1064 research team, co-leading the pluripotency and embryo development group. His main fields of interest are embryology, time-lapse, ovarian reserve, proteomics and sperm physiology.

### KEY MESSAGE

Studies reporting an association between morphokinetic parameters and embryo ploidy status are controversial and do not support the predictive value of time-lapse analysis for embryo aneuploidy screening.

## ABSTRACT

Embryo morphology assessment performs relatively poorly in predicting implantation. Embryo aneuploidy screening (PGS) has recently improved, but its clinical value is still debated, and the development of a cheap non-invasive method for the assessment of embryo ploidy status is a highly desirable goal. The growing implementation of time-lapse devices led some teams to test the effectiveness of morphokinetic parameters as predictors of embryo ploidy, with conflicting results. The aim of this study was to conduct a comprehensive review of the literature on the predictive value of morphokinetic parameters for embryo ploidy status. A systematic search on PubMed was conducted using the following key words: time-lapse, morphokinetic, aneuploidy, IVF, preimplantation genetic screening, PGS, chromosomal status. A total of 13 studies were included in the analysis. They were heterogeneous in design, patients, day of embryo biopsy, statistical approach and outcome measures. No single or combined morphokinetic parameter was consistently identified as predictive of embryo ploidy status. In conclusion, the available studies are too heterogeneous for firm conclusions to be drawn on the predictive value of time-lapse analysis for embryo aneuploidy screening. Hence, morphokinetic parameters should not be used yet as a surrogate for PGS to determine embryo ploidy *in vitro*.

© 2018 Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author.  
E-mail address: [thomas.freour@chu-nantes.fr](mailto:thomas.freour@chu-nantes.fr) (T. Freour).  
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.01.001>

## Introduction

The ultimate objective of assisted reproduction techniques is to offer patients the highest healthy live birth rate and the lowest multiple pregnancy rate. Morphology is the most common method used for evaluating embryo quality *in vitro*; however, it performs poorly in identifying the embryo with the highest implantation potential, even at the blastocyst stage (Gardner et al., 2015). This prevents many IVF teams implementing a largely single embryo transfer policy (Kushnir et al., 2017). Embryo morphology assessment has little predictive power for implantation because of its weak association with embryo ploidy status, which is the most critical factor for sustained implantation in IVF (Gardner et al., 2015). Embryo aneuploidy screening, also known as preimplantation genetic screening (PGS), allows the identification of embryo chromosomal status. Several technical improvements over the past decade have led to the identification of trophectoderm biopsy and array comparative genetic hybridization (aCGH) or next-generation sequencing as the technique of choice for PGS (Gardner et al., 2015). Although shown to be efficient and clinically relevant in some studies, this technique suffers from some limitations. Indeed, it raises regulatory issues in some countries (Harper et al., 2014), it can be considered invasive, it requires specific technical skills, it can take up to 24 h before obtaining the result according to the technique, and it still remains expensive (Gardner et al., 2015; Sermon et al., 2016). Therefore, the development of a non-invasive, rapid, and cheaper method for assessing embryo ploidy status would represent a breakthrough in the field of IVF (Gardner et al., 2015). The recent implementation of time-lapse devices in more IVF laboratories, allowing continuous embryo monitoring in stable culture conditions, has raised hopes among many embryologists. Although the clinical value of this strategy has been validated in some studies (Petersen et al., 2016; Rubio et al., 2014), literature reviews have provided various results (Armstrong et al., 2015; Chen et al., 2017), leading to ongoing debate on this topic (Harper et al., 2017). Among the numerous studies reported on time-lapse, some have evaluated the association between morphokinetic parameters and embryo ploidy to evaluate if time lapse could be the awaited non-invasive method for embryo aneuploidy screening. These studies provided discordant conclusions. They were conducted in various settings, with heterogeneous design, procedures and populations, ultimately failing to yield a firm conclusion.

Therefore, the aim of this study was to conduct a comprehensive review of the literature on the predictive value of morphokinetic parameters for embryo ploidy status.

## Materials and methods

We conducted a systematic search on *Medline* of all articles related to time-lapse (or morphokinetic) analysis of human preimplantation embryo development and its association with aneuploidy evaluated with PGS technology published up to April 2017 using the *Pubmed* database with the following keywords: time-lapse, morphokinetic, aneuploidy, IVF, preimplantation genetic screening, PGS and chromosomal status.

This search was conducted according to Prisma guidelines (<http://www.prisma-statement.org/>), and only full-length articles in English dealing with clinical observations in humans were included. The principal summary measure was the predictive value of time-lapse

parameters for embryo ploidy. Comparison with a control group was not mandatory. No statistical tests were carried out with these data. All references were screened, and eligibility assessed by two independent reviewers (AR and JL). A third author (TF) checked the final list of references and made the final decision in case of disagreement.

The following data were extracted from the selected articles: study design, number of couples, clinical indication for PGS, number of embryos, embryo stage for biopsy, PGS technique, time-lapse device, embryo culture atmosphere, morphokinetic parameters studied, euploidy rate, clinical outcome measure, adjustment with patients' characteristics, relevant morphokinetic variables identified, statistical approach and main conclusion.

## Results

A total of 161 studies were screened for eligibility. All records were screened, and 148 were excluded. A total of 15 full-text articles were assessed in detail for eligibility, among which two were excluded because they were conducted in preimplantation genetic diagnosis cycles rather than in PGS cycles, thus not allowing full information on embryo ploidy status to be obtained. Finally, 13 were selected for data collection on the predictive value of morphokinetic analysis for human embryo ploidy (Balakier et al., 2016; Basile et al., 2014; Campbell et al., 2013a, 2013b; Chavez et al., 2012; Chawla et al., 2015; Del Carmen Nogales et al., 2017; Kramer et al., 2014; Minasi et al., 2016; Mumusoglu et al., 2017; Patel et al., 2016; Rienzi et al., 2015; Yang et al., 2014) (Table 1).

Most studies were retrospective. Only two were prospective, with one conducted on embryos donated for research (Chavez et al., 2012) and the other one on clinical cycles (Yang et al., 2014). The number of couples and IVF-PGS cycles included in these studies varied significantly, ranging from 25 (Campbell et al., 2013a) to 444 (Minasi et al., 2016), and from 25 (Campbell et al., 2013a) to 530 (Minasi et al., 2016), respectively. Similarly, the number of embryos included in the analysis was heterogeneous in these studies, ranging from 53 (Chavez et al., 2012) to 928 (Minasi et al., 2016).

The clinical indication for PGS varied notably among these studies, even if most of them were conventional PGS cases, i.e. advanced maternal age, recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. Only one study was conducted in PGS cycles for sex selection (Chawla et al., 2015) and one in couples with previous aneuploidy conceptions (Yang et al., 2014). Two studies included cases of PGS for severe male factor infertility in addition to conventional PGS indications (Balakier et al., 2016; Campbell et al., 2013a). Clinical indication for PGS could not be found in two studies (Campbell et al., 2013b; Minasi et al., 2016).

Embryo biopsy was carried out at cleavage stage in five studies (Basile et al., 2014; Chavez et al., 2012; Chawla et al., 2015; Del Carmen Nogales et al., 2017; Patel et al., 2016) and at the blastocyst stage in eight studies (Balakier et al., 2016; Campbell et al., 2013a, 2013b; Kramer et al., 2014; Minasi et al., 2016; Mumusoglu et al., 2017; Rienzi et al., 2015; Yang et al., 2014). When performed at the cleavage stage, no morphokinetic data were provided on subsequent embryo development, except in one study (Patel et al., 2016).

All studies but one (Chavez et al., 2012) were carried out with the Embryoscope® as time-lapse device. Although unlikely, whether the type of time-lapse device used could influence the eventual association of morphokinetic parameters with embryo ploidy status is not

Table 1 – Principal characteristics of the studies reporting on the value of morphokinetic parameters as predictors of embryo ploidy. Studies are listed in chronological order.

	Study design	Number of couple/ cycles	Clinical indication for PGS	Number of embryos	Embryo stage for biopsy	PGS technique	Time- lapse device	Atmosphere
Chavez et al. (2012)	Prospective on donated zygotes	45/NA	NA	53	Day 2	aCGH	custom-built miniature microscope system	6% CO <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub>
Campbell et al. (2013a)	Retrospective	25/25	AMA, RIF, recurrent miscarriage, severe male factor	98	Blastocyst	aCGH or SNP array	Embryoscope®	5.5% CO <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub>
Campbell et al. (2013b)	Retrospective/ validation study	69/69	Unknown	88	Blastocyst	aCGH or SNP array	Embryoscope®	5.5% CO <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub>
Basile et al. (2014)	Retrospective	87/125	RIF and recurrent miscarriage	504	Day 3	aCGH	Embryoscope®	Not described
Kramer et al. (2014)	Retrospective/ validation study	25/25	Recurrent miscarriage, AMA, others	149	Blastocyst	aCGH	Embryoscope®	6% CO <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub>
Yang et al. (2014)	Prospective	NA	RPL, RIF, PCA	285	Blastocyst	aCGH	Embryoscope®	6% CO <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub>
Chawla et al. (2015)	Retrospective	132/132	Sex selection	460	Day 3	aCGH	Embryoscope®	Not described
Rienzi et al. (2015)	Retrospective/ validation study	138/138	AMA, RIF, recurrent miscarriage	455	Blastocyst	aCGH	Embryoscope®	6% CO <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub>
Minasi et al. (2016)	Retrospective	444/530	Unknown	1730/928 cultured in time-lapse	Blastocyst	aCGH	Embryoscope®	6% CO <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub>
Balakier et al. (2016)	Retrospective	296 (113 with PGS)/296 (113)	AMA, PCOS, male factor and others	2441/607 with PGS	Blastocyst	aCGH	Embryoscope®	6% CO <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub>
Patel et al. (2016)	Retrospective	26/29	AMA, RIF, recurrent miscarriage	167	Day 3	aCGH	Embryoscope®	Not described
Mumusoglu et al. (2017)	Retrospective/ validation study	103/103	AMA, PGD	415	Blastocyst	aCGH	Embryoscope®	6.8% CO <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub>
Del Carmen Nogales et al. (2017)	Retrospective	112/112	AMA, RIF and recurrent miscarriage	485	Day 3	aCGH	Embryoscope®	Not described

(continued on next page)

Table 1 – (continued)

	Euploidy rate (%)	Clinical outcome measures	Morphokinetic parameters studied	Relevant morphokinetic variables	Adjusted with patients' characteristics	Statistical approach	Conclusion
Chavez et al. (2012)	24.5	NA	All up to day 2	cc2, s2	No	Mean comparison	Cell-cycle parameters could be diagnostic of ploidy and have clinical relevance.
Campbell et al. (2013a)	38.8	NA	All up to blastocyst stage	tSB, tB	No	Mean comparison; Fisher's test; decision-tree model	Late time-lapse parameters increase the probability of selecting euploid embryos.
Campbell et al. (2013b)	NA <sup>a</sup>	CPR and LBR	All up to blastocyst stage	tSB, tB	No	Decision-tree model	Late time-lapse parameters increases the probability of selecting euploid embryos.
Basile et al. (2014)	28.3	Implantation rate and CPR	All up to day 3	t5, t5–t2, cc3	No	Mean comparison; quartiles; logistic regression; ROC curve; decision tree	Time-lapse-based algorithm increases the probability of selecting euploid embryos.
Kramer et al. (2014)	43	NA	All up to blastocyst stage	None	No	Chi-squared ; ANOVA, ROC curve	Failure of Campbell's model. Time-lapse parameters cannot be used to select euploid blastocysts
Yang et al. (2014)	46	Implantation rate, OPR	All up to blastocyst stage	None	No	Mean and frequency comparison	Time-lapse increases the probability of non-invasively selecting normal embryos.
Chawla et al. (2015)	42.8	NA	All up to day 3	t5–t2, cc3	No	Mean and frequency comparison; logistic regression; ROC curve	Time-lapse increases the probability of non-invasively selecting normal embryos.
Rienzi et al. (2015)	40.9	OPR and LBR	All up to blastocyst stage	None	Yes	Bivariate generalized mixed models, linear logistic model	Failure of Campbell and Basile's models. Time-lapse parameters Cannot be used to select euploid blastocysts.
Minasi et al. (2016)	34.9	CPR	All up to blastocyst stage	tSB, tB, tEB, tHB	Yes	Mixed logistic models; mixed linear regression	Late time-lapse parameters are different in euploid and aneuploidy embryos but do not improve clinical outcome.
Balakier et al. (2016)	49.8	Implantation rate, CPR and LBR	All up to blastocyst stage plus multinucleation at two- and four-cell stages	NA	Yes	Mean comparison, logistic regression	High implantation rate, even for embryos with multinucleation at the two-cell stage.
Patel et al. (2016)	24.5	NA	All up to blastocyst stage	t5–t2, cc3	No	Mean comparison; chi squared; quartiles; logistic regression; ROC curve	Time-lapse-based algorithm (Basile et al., 2014) increases the probability of selecting euploid embryos but should not replace PGS.
Mumusoglu et al. (2017)	41.7	NA	All up to blastocyst stage	t9, tM, tSB, tB, tEB	Yes	Clustered data analysis	Failure of most models and late time-lapse parameters to predict euploidy.
Del Carmen Nogales et al. (2017)	38.1	NA	All up to day 3	t3, t5–t2	No	Mean comparison; chi squared; quartiles; logistic regression analysis	Time-lapse is useful to discard embryos with high risk of complex aneuploidies.

<sup>a</sup> Validation study conducted in non-PGS cycles.

aCGH, array comparative genetic hybridization; AMA, advanced maternal age; ANOVA, analysis of variance; CPR, clinical pregnancy rate; LBR: live birth rate; NA, not applicable; OPR, ongoing pregnancy rate; PCA, previous aneuploidy conceptions; PCOS, polycystic ovary syndrome; PGD, preimplantation genetic diagnosis; PGS, preimplantation genetic screening; RIF, recurrent implantation failure; ROC, receiver operator characteristic; SNP, single nucleotide polymorphism.

known, as no comparative study has yet been conducted. Although embryo culture atmosphere was not reported in four studies (Basile et al., 2014; Chawla et al., 2015; Del Carmen Nogales et al., 2017; Patel et al., 2016), it was carried out under low oxygen tension in the nine remaining studies.

All studies on PGS technique were based on aCGH, allowing the evaluation of all chromosomes. Only two studies from the same group reported using both aCGH and single nucleotide polymorphism array (Campbell et al., 2013a, 2013b). Euploidy rate was reported in 12 studies (not applicable in Campbell et al., [2013b]), which was conducted in non-PGS cycles) and ranged from 24.5% (Chawla et al., 2015) to 49.8% (Balakier et al., 2016), with a trend towards higher euploidy rate when biopsy was carried out at the blastocyst stage than at the cleavage stage.

Six studies included clinical outcome measures after a PGS cycle (Balakier et al., 2016; Basile et al., 2014; Campbell et al., 2013b; Minasi et al., 2016; Rienzi et al., 2015; Yang et al., 2014). Most of them used clinical pregnancy rate; some also used implantation rate or live birth rate.

Concerning the morphokinetic parameters studied, all studies reported morphokinetic parameters up to embryo biopsy, including pronuclei appearance and fading, cellular cleavage timings and intervals, compaction and blastocyst formation and expansion. One study also reported multinucleation at the two-cell and four-cell stages (Balakier et al., 2016). Among the 13 selected studies, 11 aimed at identifying relevant morphokinetic variables, which could be significantly different between euploid and aneuploidy groups, and finally help in selecting euploid embryos for transfer, whereas two consisted of external validation of previously published models (Campbell et al., 2013b; Kramer et al., 2014). Studies conducted in early cleavage embryos mostly identified intervals between cleavages rather than cleavage timings as relevant for identifying euploid embryos (Basile et al., 2014; Chavez et al., 2012; Chawla et al., 2015; Del Carmen Nogales et al., 2017; Patel et al., 2016). Some studies conducted at the blastocyst stage identified late morphokinetic parameters, i.e. compaction or blastulation stages, but not early ones (cleavage stages) as relevant predictors of embryo ploidy (Campbell et al., 2013a; Minasi et al., 2016; Mumusoglu et al., 2017). Not all studies, however, conducted at the blastocyst stage reported significant morphokinetic differences between euploid and aneuploid embryos (Rienzi et al., 2015; Yang et al., 2014).

In addition to the studies aimed at identifying predictive morphokinetic markers, other investigators have conducted external validation of some previously published morphokinetic models. The model by Campbell et al. (2013a) was evaluated externally by Kramer et al. (2014) and by themselves in a separate cohort (Campbell et al., 2013b). Patel et al. (2016) tested the performance of the model by Basile et al. (2014). Rienzi et al. (2015) and Mumusoglu et al. (2017) tested the performance of both Campbell's and Basile's models, both concluding that the models failed to predict embryo euploidy.

Statistical approach varied greatly among these 13 studies, depending on the main outcome measure and study design. Most studies performed basic univariate analysis to compare morphokinetic parameters in euploid and aneuploid embryos. Most studies also carried out logistic regression analysis to identify some independent predictors of embryo ploidy, eventually integrated in a predictive model. The sensitivity and specificity of the model was then evaluated with receiver operator characteristic curve analysis when appropriate (Basile et al., 2014; Chawla et al., 2015; Kramer et al., 2014; Patel et al., 2016). Importantly, few authors emphasized the possible bias of considering

embryos as individuals in statistical analysis, as all embryos originating from the same patient are influenced by those patient-specific characteristics and are, therefore, not independent entities ('cohort effect'). Therefore, these investigators strongly recommended the adjustment of statistical analysis and its results with patient characteristics (Kirkegaard et al., 2016; Mumusoglu et al., 2017).

Finally, most, but not all, investigators reported significant differences in morphokinetic pattern between euploid and aneuploid embryos, but the clinical significance of these results was absent to modest (Table 1). Although the conclusions raised by investigators varied significantly, all concluded that time-lapse should not be considered as an appropriate non-invasive method for embryo ploidy assessment.

---

## Discussion

This comprehensive review of the literature on the effectiveness of time-lapse as a predictor of embryo ploidy highlights the large heterogeneity of the studies published to date, concluding that neither a unique morphokinetic nor combined parameters could predict embryo ploidy with enough sensitivity, specificity, or both, to be used clinically for embryo selection.

First, most studies reviewed here were carried out retrospectively and within a single clinic, with different sample sizes. Although this does not necessarily lessen their value, there is a need for large multi-centre studies to enhance the overall quality of the evidence generated.

The second question raised in this review concerns the type of time-lapse device. Although this should theoretically not lead to a significant difference in measuring morphokinetic parameters, it should be noted that all studies, bar one, were conducted with the Embryoscope®, the first and most widely implemented time-lapse device to date, thus providing a certain inter-study homogeneity on technical aspects. Whether the use of different approaches, as well as devices and analytical methods, in the field of time-lapse could account for the conflicting findings found within the literature is hard to determine and quantify precisely. This should be explored in further studies. The issue of inter-operator variability in annotating morphokinetic parameters could eventually be raised, thus encouraging the development of automated annotation tools (Castello et al., 2016; Molder et al., 2015). Although this variability has been shown to be low (Sundvall et al., 2013), it is unclear how widely guidelines for annotation practice (Ciray et al., 2014) are followed and how consistent time-lapse users are in their operating procedures. Whether more recent time-lapse devices with automated detection of cell cleavages will provide different results and lead to different conclusions still needs to be tested.

Although the clinical indication for PGS varied notably among the studies, the main indications were advanced maternal age, recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. It is, therefore, unlikely that differences in clinical indications would explain the discrepancy in conclusions of the studies cited here. Some patient characteristics, however, have been shown by some investigators to be critical for interpreting morphokinetic studies, as embryos from the same patient tend to cluster (Kirkegaard et al., 2016; Mumusoglu et al., 2017). This point will be discussed further in the discussion.

The most significant difference between the studies reviewed here was the stage at which embryo biopsy was carried out. Indeed, embryo biopsy was carried out at the cleavage stage in five studies (Basile

et al., 2014; Chavez et al., 2012; Chawla et al., 2015; Del Carmen Nogales et al., 2017; Patel et al., 2016), whereas embryo biopsy was carried out at the blastocyst stage in eight studies (Balakier et al., 2016; Campbell et al., 2013a, 2013b; Kramer et al., 2014; Minasi et al., 2016; Mumusoglu et al., 2017; Rienzi et al., 2015; Yang et al., 2014). The respective advantages and disadvantages of these two strategies have been debated in recent years (Scott et al., 2013; Sermon et al., 2016). Trophoctoderm biopsy, however, has gained increasing interest, and is more widely used, as it is considered to optimize the whole procedure when fewer embryos are available, but with higher implantation potential than cleavage stage biopsy (Sermon et al., 2016). Moreover, it allows the biopsy of several cells and probably allows a better management of embryo mosaicism (Capalbo et al., 2013). Whether trophoctoderm biopsy is more relevant than cleavage stage biopsy for PGS was not the topic of this review. Recent data, however, obtained in arrested embryos cultured in time-lapse device and extensively analysed by genome-wide SNP genotyping in both polar bodies and karyomapping of disaggregated embryonic cells, suggest that genomic imbalance and partial genome loss occurring during early cleavage affects embryonic gene expression and blocks the morula to blastocyst transition (Ottolini et al., 2017). This reinforces the value of trophoctoderm biopsy compared with performing biopsy pre-zygote genome activation at the cleavage stages of development. The present comprehensive review of the literature could eventually be repeated and specifically focus on morphokinetic follow-up up to the blastocyst stage followed by trophoctoderm biopsy when more studies are available.

Various technical approaches can be used for PGS. Here, all studies were based on aCGH, with two of them also using single nucleotide polymorphism array (Campbell et al., 2013a, 2013b). Whether the implementation of new technologies for embryo aneuploidy screening, such as next-generation sequencing, brings new insights into the association between morphokinetic parameters and embryo ploidy should be explored in further studies.

Embryo culture conditions could constitute a bias in assessing morphokinetics. Indeed, low oxygen tension has been shown to result in significantly different morphokinetic patterns (Kirkegaard et al., 2016) than atmospheric ones. Although this was not reported in four studies, most of them included in this review were conducted under low oxygen tension.

Six studies included clinical outcome measures after PGS cycle (Balakier et al., 2016; Basile et al., 2014; Campbell et al., 2013b; Minasi et al., 2016; Rienzi et al., 2015; Yang et al., 2014). Interpreting these data, however, remains hazardous, as none of them was specifically designed to determine the relevance of morphokinetic parameters in predicting clinical outcome after PGS cycle.

Concerning the type of morphokinetic parameters analysed, studies with trophoctoderm biopsy obviously included additional data compared with those conducted in cleavage stage embryos. These studies mostly concluded that intervals between cellular cleavages were more relevant than cleavage timings for the selection of euploid embryos (Basile et al., 2014; Chavez et al., 2012; Chawla et al., 2015; Del Carmen Nogales et al., 2017; Patel et al., 2016). This value of cellular intervals was previously suggested in clinical studies conducted in IVF cycles aimed at identifying morphokinetic predictors of implantation (Meseguer et al., 2011). Not all studies carried out at the blastocyst stage reported significant morphokinetic differences between euploid and aneuploid embryos (Rienzi et al., 2015; Yang et al., 2014), but most did (Campbell et al., 2013a; Minasi et al., 2016; Mumusoglu et al., 2017). Interestingly, these studies did not confirm the value of these early

parameters as relevant predictors of embryo ploidy (Campbell et al., 2013a; Minasi et al., 2016; Mumusoglu et al., 2017). As genetic events, such as mitotic errors, genomic imbalance or genome loss, occur during late embryo development after embryo genomic activation (Capalbo et al., 2013; Ottolini et al., 2017), this might account for this apparent loss of predictive value of early morphokinetic parameters for embryo ploidy when evaluated at the blastocyst stage. This, however, remains to be confirmed in longitudinal studies with cleavage stage and blastocyst biopsy successively performed.

Finally, the recently raised issue of statistical approach and adjustment for patients' characteristics to take clustering effect into account in time-lapse studies (Kirkegaard et al., 2016) was also questioned in three studies included in this review (Minasi et al., 2016; Mumusoglu et al., 2017; Rienzi et al., 2015), and, particularly, in one of them (Mumusoglu et al., 2017). The concept of this approach is that embryos generated from one couple should not be considered individually. Instead, the statistical approach should consider intra-patient clustering effect to determine the extent to which the morphokinetic variation observed is independent of patient's clinical or cycle characteristics (Kirkegaard et al., 2016). In the study by Mumusoglu et al. (2017), 16–47% of the observed variation of morphokinetic parameters was found to be patient-related. Interestingly, the investigators concluded that considering embryos as individuals in statistical analysis could represent a major bias, leading to overestimated statistical associations and potentially incorrect conclusions, especially in heterogeneous populations. This was also highlighted in a commentary published in 2014 (Ottolini et al., 2014), in which the authors comment on the studies reported by Campbell et al. (2013a), Campbell et al. (2013b). The authors of this commentary particularly questioned the reported association between morphokinetic parameters and implantation, as no female age was provided, and insisted on the importance of confounding factors such as age in this non-age-controlled cohort. This was further debated by Campbell et al. (2014), who stated that age was not the likely causal factor of observed delays in blastulation.

---

## Conclusion

This comprehensive review of the literature demonstrates that morphokinetic parameters should not yet be used as a surrogate for PGS to determine chromosomal status of the preimplantation embryo. More large-scale studies, conducted in homogeneous populations with standard culture and biopsy protocol, using relevant statistical approaches adjusted to patients' characteristics, are needed to gain insight into the putative association between embryo morphokinetic parameters and ploidy, ultimately improving IVF clinical outcome.

---

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 8 August 2017

Received in revised form 3 January 2018

Accepted 4 January 2018

*Declaration: The authors report no financial or commercial conflicts of interest.*



**Keywords:**

Time-lapse

Morphokinetic

Aneuploidy

Preimplantation genetic screening

## REFERENCES

- Armstrong, S., Arroll, N., Cree, L.M., Jordan, V., Farquhar, C., 2015. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst. Rev.* [27], CD011320.
- Balakier, H., Sojecki, A., Motamedi, G., Librach, C., 2016. Impact of multinucleated blastomeres on embryo developmental competence, morphokinetics, and aneuploidy. *Fertil. Steril.* 106, 608–614.
- Basile, N., Del Carmen Nogales, C., Bronet, F., Florensa, M., Riqueiros, M., Rodrigo, L., García-Velasco, J., Meseguer, M., 2014. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil. Steril.* 101, 699–704.
- Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., Hickman, C.F., 2013a. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod. Biomed. Online* 26, 477–485.
- Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., Thornton, S., 2013b. Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS. *Reprod. Biomed. Online* 27, 140–146.
- Campbell, A., Fishel, S., Laegdsmand, M., 2014. Aneuploidy is a key causal factor of delays in blastulation: author response to 'A cautionary note against aneuploidy risk assessment using time-lapse imaging'. *Reprod. Biomed. Online* 28, 279–283.
- Capalbo, A., Bono, S., Spizzichino, L., Biricik, A., Baldi, M., Colamaria, S., Ubaldi, F.M., Rienzi, L., Fiorentino, F., 2013. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum. Reprod.* 28, 509–518.
- Castello, D., Motato, Y., Basile, N., Remohi, J., Espejo-Catena, M., Meseguer, M., 2016. How much have we learned from time-lapse in clinical IVF? *Mol. Hum. Reprod.* 22, 719–727.
- Chavez, S.L., Loewke, K.E., Han, J., Moussavi, F., Colls, P., Munne, S., Behr, B., Reijo Pera, R.A., 2012. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nat. Commun.* 3, 1251.
- Chawla, M., Fakhri, M., Shunnar, A., Bayram, A., Hellani, A., Perumal, V., Divakaran, J., Budak, E., 2015. Morphokinetic analysis of cleavage stage embryos and its relationship to aneuploidy in a retrospective time-lapse imaging study. *J. Assist. Reprod. Genet.* 32, 69–75.
- Chen, M., Wei, S., Hu, J., Yuan, J., Liu, F., 2017. Does time-lapse imaging have favorable results for embryo incubation and selection compared with conventional methods in clinical in vitro fertilization? A meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. *PLoS ONE* 12, e0178720.
- Ciray, H.N., Campbell, A., Agerholm, I.E., Aguilar, J., Chamayou, S., Esbert, M., Sayed, S., Time-Lapse User Group., 2014. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum. Reprod.* 29, 2650–2660.
- Del Carmen Nogales, M., Bronet, F., Basile, N., Martinez, E.M., Linan, A., Rodrigo, L., Meseguer, M., 2017. Type of chromosome abnormality affects embryo morphology dynamics. *Fertil. Steril.* 107, 229–235.
- Gardner, D.K., Meseguer, M., Rubio, C., Treff, N.R., 2015. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum. Reprod. Update* 21, 727–747.
- Harper, J., Geraedts, J., Borry, P., Cornel, M.C., Dondorp, W.J., Gianaroli, L., Harton, G., Milachich, T., Kääriäinen, H., Liebaers, I., Morris, M., Sequeiros, J., Sermon, K., Shenfield, F., Skirton, H., Soini, S., Spits, C., Veiga, A., Vermeesch, J.R., Viville, S., de Wert, G., Macek, M., Jr., ESHG, ESHRE, EuroGentest2, 2014. Current issues in medically assisted reproduction and genetics in Europe: research, clinical practice, ethics, legal issues and policy. *Hum. Reprod.* 29, 1603–1609.
- Harper, J., Jackson, E., Sermon, K., Aitken, R.J., Harbottle, S., Mocanu, E., Hardarson, T., Mathur, R., Viville, S., Vail, A., Lundin, K., 2017. Adjuncts in the IVF laboratory: where is the evidence for 'add-on' interventions? *Hum. Reprod.* 32, 485–491.
- Kirkegaard, K., Sundvall, L., Erlandsen, M., Hindkjaer, J.J., Knudsen, U.B., Ingerslev, H.J., 2016. Timing of human preimplantation embryonic development is confounded by embryo origin. *Hum. Reprod.* 31, 324–331.
- Kramer, Y.G., Kofinas, J.D., Melzer, K., Noyes, N., McCaffrey, C., Buldo-Licciardi, J., McCulloh, D.H., Grifo, J.A., 2014. Assessing morphokinetic parameters via time lapse microscopy (TLM) to predict euploidy: are aneuploidy risk classification models universal? *J. Assist. Reprod. Genet.* 31, 1231–1242.
- Kushnir, V.A., Barad, D.H., Albertini, D.F., Darmon, S.K., Gleicher, N., 2017. Systematic review of worldwide trends in assisted reproductive technology 2004–2013. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 15, 6–14.
- Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsoe, K.M., Ramsing, N.B., Remohi, J., 2011. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum. Reprod.* 26, 2658–2671.
- Minasi, M.G., Colasante, A., Riccio, T., Ruberti, A., Casciani, V., Scarselli, F., Spinella, F., Fiorentino, F., Varricchio, M.T., Greco, E., 2016. Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study. *Hum. Reprod.* 31, 2245–2254.
- Molder, A., Drury, S., Costen, N., Hartshorne, G.M., Czanner, S., 2015. Semiautomated analysis of embryoscope images: using localized variance of image intensity to detect embryo developmental stages. *Cytometry A* 87, 119–128.
- Mumusoglu, S., Yarali, I., Bozdog, G., Ozdemir, P., Polat, M., Sokmensuer, L.K., Yarali, H., 2017. Time-lapse morphokinetic assessment has low to moderate ability to predict euploidy when patient- and ovarian stimulation-related factors are taken into account with the use of clustered data analysis. *Fertil. Steril.* 107, 413–421.
- Ottolini, C., Rienzi, L., Capalbo, A., 2014. A cautionary note against embryo aneuploidy risk assessment using time-lapse imaging. *Reprod. Biomed. Online* 28, 273–275.
- Ottolini, C.S., Kitchen, J., Xanthopoulou, L., Gordon, T., Summers, M.C., Handyside, A.H., 2017. Tripolar mitosis and partitioning of the genome arrests human preimplantation development in vitro. *Sci. Rep.* 7, 9744–9753.
- Patel, D.V., Shah, P.B., Kotdawala, A.P., Herrero, J., Rubio, I., Banker, M.R., 2016. Morphokinetic behavior of euploid and aneuploid embryos analyzed by time-lapse in embryoscope. *J. Hum. Reprod. Sci.* 9, 112–118.
- Petersen, B.M., Boel, M., Montag, M., Gardner, D.K., 2016. Development of a generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on Day 3. *Hum. Reprod.* 31, 2231–2244.
- Rienzi, L., Capalbo, A., Stoppa, M., Romano, S., Maggiulli, R., Albricci, L., Scarica, C., Farcomeni, A., Vajta, G., Ubaldi, F.M., 2015. No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study. *Reprod. Biomed. Online* 30, 57–66.
- Rubio, I., Galan, A., Larreategui, Z., Ayerdi, F., Bellver, J., Herrero, J., Meseguer, M., 2014. Clinical validation of embryo culture and

- selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil. Steril.* 102, 1287–1294.
- Scott, R.T., Jr., Upham, K.M., Forman, E.J., Zhao, T., Treff, N.R., 2013. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil. Steril.* 100, 624–630.
- Sermon, K., Capalbo, A., Cohen, J., Coonen, E., De Rycke, M., De Vos, A., Delhanty, J., Fiorentino, F., Gleicher, N., Griesinger, G., Grifo, J., Handside, A., Harper, J., Kokkali, G., Mastenbroek, S., Meldrum, D., Meseguer, M., Montag, M., Munné, S., Rienzi, L., Rubio, C., Scott, K., Scott, R., Simon, C., Swain, J., Treff, N., Ubaldi, F., Vassena, R., Vermeesch, J.R., Verpoest, W., Wells, D., Geraedts, J., 2016. The why, the how and the when of PGS 2.0: current practices and expert opinions of fertility specialists, molecular biologists, and embryologists. *Mol. Hum. Reprod.* 22, 845–857.
- Sundvall, L., Ingerslev, H.J., Breth Knudsen, U., Kirkegaard, K., 2013. Inter- and intra-observer variability of time-lapse annotations. *Hum. Reprod.* 28, 3215–3221.
- Yang, Z., Zhang, J., Salem, S.A., Liu, X., Kuang, Y., Salem, R.D., Liu, J., 2014. 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 Med. Genomics* 7, 38.

Après avoir tenu cette revue de la littérature, il nous est paru intéressant d'étudier l'existence d'un lien entre morphocinétique embryonnaire et statut chromosomique sur notre propre population. En l'absence d'accès à des données de morphocinétique pour des embryons ayant été biopsiés dans le cadre du DPI-A, étant donné la législation restrictive de la France à ce sujet, nous nous sommes intéressés aux embryons biopsiés dans le cadre du DPI avec indication chromosomique. Ainsi la morphocinétique embryonnaire des embryons sains / équilibrés a été comparée à celle d'embryons porteurs du réarrangement chromosomique identifié chez le couple pris en charge en DPI, bien que les embryons sains / équilibrés puissent également être porteurs d'autres réarrangements chromosomiques non identifiables lors du DPI.

## Article 4

### **Morphokinetic Parameters in Chromosomal Translocation Carriers Undergoing Preimplantation Genetic Testing**

Résumé détaillé en Français

#### Question

Est-ce que la morphocinétique embryonnaire peut aider à identifier les embryons déséquilibrés pour les couples porteurs de translocation ?

#### Matériel et méthodes

Cette étude rétrospective a été réalisée chez 67 couples porteurs d'une translocation au cours de 105 cycles de diagnostic pré-implantatoire pour réarrangement chromosomique sans diagnostic d'aneuploïdie. A l'aide d'un système time-lapse, les paramètres morphocinétiques ont été comparés entre les embryons équilibrés et déséquilibrés, ainsi que la fréquence des événements du cycle cellulaire anormaux. La performance d'un modèle prédictif d'aneuploïdie déjà publié a aussi été testé dans cette population.

#### Résultats

Une différence significative a été observée entre les embryons équilibrés et déséquilibrés pour quelques paramètres morphocinétiques  $t_5$  ( $P = 0.0067$ ),  $t_{9+}$  ( $P = 0.0077$ ),  $cc_2$  ( $P = 0.0144$ ),  $s_2$  ( $P = 0.0003$ ) et  $t_5-t_2$  ( $P = 0.0028$ ). Également, la présence de multinucléation aux stades 2 ou 4 cellules, les divisions anormales et l'exclusion cellulaire au stade morula étaient significativement plus fréquents pour les embryons déséquilibrés que pour les embryons équilibrés. Cependant, aucun paramètre ne pouvait prédire de façon précise le statut chromosomique des embryons. Un modèle prédictif d'aneuploïdie déjà publié n'a pas permis de classer correctement les embryons équilibrés et déséquilibrés.

#### Conclusions

Aucun paramètre morphocinétique prédictif du statut chromosomique n'a pu être identifié. La technologie time-lapse ne doit pas être utilisée comme outil diagnostique de statut chromosomique chez les porteurs de translocation.

## ARTICLE



# Morphokinetic parameters in chromosomal translocation carriers undergoing preimplantation genetic testing

**BIOGRAPHY**

Thomas Freour, PharmD, PhD, is the head of the ART Centre at the University Hospital of Nantes, France. He is also a member of the UMR1064 research team, co-leading the pluripotency and embryo development group. His main fields of interest are embryology, time-lapse, ovarian reserve, proteomics and sperm physiology.

Jenna Lammers<sup>1,2</sup>, Arnaud Reignier<sup>1,2,3</sup>, Carole Splingart<sup>1,2</sup>, Kamran Moradkhani<sup>4</sup>, Paul Barrière<sup>1,2,3</sup>, Thomas Fréour<sup>1,2,3,\*</sup>

**KEY MESSAGE**

Although significant morphokinetic differences exist between balanced and unbalanced embryos in translocation carriers undergoing preimplantation genetic testing for structural rearrangement cycle without aneuploidy screening, no relevant morphokinetic predictor of embryo chromosomal status could be found.

**ABSTRACT**

**Research question:** Can embryo morphokinetic parameters help identify unbalanced embryos in translocation carriers?

**Design:** This retrospective study was conducted in 67 translocation carriers undergoing 105 preimplantation genetic testing cycles for chromosomal structural rearrangements (PGT-SR) without aneuploidy screening (PGT-A). Using time-lapse imaging analysis, morphokinetic parameters of balanced and unbalanced embryos were compared, as well as the frequency of abnormal cellular events. The performance of a previously published prediction model of aneuploidy was also tested in this population.

**Results:** Significant differences were observed between balanced and unbalanced embryos for some morphokinetic parameters: t5 ( $P = 0.0067$ ), t9+ ( $P = 0.0077$ ), cc2 ( $P = 0.0144$ ), s2 ( $P = 0.0003$ ) and t5–t2 ( $P = 0.0028$ ). Also, multinucleation at the two- or four-cell stages, abnormal division and cell exclusion at the morula stage were significantly (all  $P < 0.05$ ) more frequent in unbalanced than in balanced embryos. None, however, could accurately predict embryo chromosomal status. A previously published morphokinetic prediction model for embryo aneuploidy did not adequately classify balanced and unbalanced embryos.

**Conclusions:** No significant morphokinetic predictor of chromosomal status could be found. Time-lapse should not be used as a diagnostic tool for chromosomal status in translocation carriers.

<sup>1</sup> Service de Médecine de la Reproduction, CHU Nantes, 38 boulevard Jean Monnet, Nantes Cedex 44093, France

<sup>2</sup> Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>3</sup> Faculté de médecine, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>4</sup> Laboratoire de cytogénétique, Service de génétique médicale, CHU Nantes, Nantes, France

**KEYWORDS**

Aneuploidy  
PGT  
Prediction model  
Time-lapse  
Translocation

## INTRODUCTION

Preimplantation genetic testing (PGT) is a procedure developed in the early 1990s for couples with a high risk of transmitting a genetic abnormality or with a high risk of miscarriage because of chromosomal structural rearrangement (*Harton et al., 2011*). Pre-implantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) consists of the evaluation of embryo ploidy, as reflected by the number of copies of each chromosome, and allows the selection of euploid embryos for transfer. Although the exact clinical benefit of PGT-A in subgroups of patients is still discussed and remains to be calculated, this approach is generally considered to result in a shorter time before pregnancy and higher pregnancy rate per transfer than conventional IVF and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) (*Dahdouh et al., 2015*). Indeed, aneuploidy is commonly observed in human embryos obtained by IVF procedure, even in embryos developing to the blastocyst stage with good morphology, and accounts for the relatively limited implantation rate observed in human IVF cycles. The presence of chromosomal translocation in one or both partners in a couple is a situation with a particularly high risk of embryo aneuploidy. When authorized by regulation, the most recent techniques allow the simultaneous use of preimplantation genetic testing cycles for chromosomal structural rearrangements (PGT-SR) and PGT-A to optimize clinical efficiency and cost-effectiveness for couples with a genetic abnormality or chromosomal structural rearrangement (*Capalbo et al., 2016a; 2016b*). Both PGT-SR and PGT-A are based on the genetic analysis of embryonic blastomeres biopsied either at the cleavage stage (day 3) or at the blastocyst stage. Therefore, the success of PGT-SR and PGT-A greatly depends on the number and quality of the embryos available for biopsy.

Since the release of the first time-lapse system in 2009, several laboratories around the world have implemented this technology to improve embryo culture conditions and evaluate embryo quality according to various morphokinetic parameters and related algorithms (*Barrie et al., 2017*). Considering that embryo ploidy is a critical factor for implantation, but that PGT is an invasive and expensive technology, a number of authors

have raised the hypothesis that the morphokinetic pattern of embryos can indirectly reflect embryo ploidy and thus be used as a surrogate for PGT-A and PGT-SR. If true, this approach could be particularly relevant in countries in which PGT-SR, PGT-A, or both, are prohibited. These studies carried out in patients referred for PGT-A because of advanced maternal age, recurrent implantation failure or recurrent pregnancy loss yielded predictive models with either no or moderate sensitivity and specificity for the identification of aneuploid embryos up to now (reviewed in *Reignier et al., 2018*). As far as we know, such studies have not been specifically conducted in translocation carriers referred for PGT-SR until now. In France, PGT is allowed for specific inherited genetic abnormalities, such as translocations, whereas PGT-A is prohibited by regulation. As translocation carriers present great risks of having unbalanced embryos (*Tobler et al., 2014*), we wondered whether these embryos would display a specific morphokinetic pattern. Therefore, our first study aim was to compare the morphokinetic parameters of balanced and unbalanced embryos in couples referred for PGT-SR. We then performed an external validation study of a published prediction model of embryo ploidy based on PGT-A results (*Basile et al., 2014*) to evaluate its performance in our local PGT-SR population referred for chromosomal rearrangement.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

This monocentric retrospective cohort study was conducted in couples referred for PGT-SR because of a chromosomal rearrangement in one of the partners. We analysed the clinical and biological data of all consecutive patients who had undergone an ICSI-PGT-SR cycle with autologous oocyte and embryo culture performed using the Embryoscope® between May 2013 and April 2016 in our University Fertility Centre. All patients gave consent for the anonymous use of their data registered in this database. This protocol was approved by the local ethics committee on 12 July 2017.

### Ovarian stimulation

Before stimulation, all women had complete ovarian reserve exploration, including FSH, LH, oestradiol, anti-Müllerian hormone and antral follicle count (AFC). All patients underwent

ovarian stimulation with the antagonist protocol. A gonadotrophin starting dose was chosen according to female age, ovarian reserve and previous IVF cycles, if they had been undertaken. Cycle monitoring consisted of hormonal assays and ultrasonography, and ovulation was triggered with recombinant HCG when at least three follicles reached 18 mm in diameter.

### Oocyte retrieval and embryo culture for PGT

Oocyte retrieval was carried out 34–36 h later. After denudation with hyaluronidase (SynVibro® hyadase, Origio, Måløv, Denmark), all mature oocytes were microinjected and immediately placed in individual microwells within a specific culture dish (Embryoslide®, Vitrolife®, Stockholm, Sweden) before being loaded into the Embryoscope® (Vitrolife®). Embryo culture was carried out at 37°C under a controlled atmosphere with low oxygen pressure (5% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub>). Sequential media was used for embryo culture (G1plus® and G2plus®).

### Time-lapse analysis

Each embryo was investigated by detailed time-lapse analysis measuring the exact timing of the developmental events in hours after ICSI procedure, as described by *Ciray et al. (2014)*. The terms t<sub>2</sub>, t<sub>3</sub>, t<sub>4</sub>, t<sub>5</sub>, t<sub>6</sub>, t<sub>7</sub> and t<sub>8</sub> were used for the exact timings of appearance of embryos with 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 well-defined blastomeres, respectively. The mean ± SD duration of cell cycle between each cleavage was also considered. The term s<sub>2</sub> is used to illustrate the synchrony of the second cell cycle, i.e. the transition from a two-cell to four-cell embryo. Also, cc<sub>2</sub> is defined as the time of the second cell cycle (t<sub>3</sub>-t<sub>2</sub>) and cc<sub>3</sub> as the time of third cell cycle (t<sub>5</sub>-t<sub>3</sub>). Abnormal division referred to chaotic cleavage, reverse cleavage or direct cleavage, all of which have been shown to lead to extremely low implantation rates (*Rubio et al., 2012; Zhan et al., 2016*).

The hierarchical model developed by *Basile et al. (2016)* was applied to all of the embryos biopsied on day 3. This model was based on the morphokinetic differences observed between euploid and aneuploid embryos and included the most relevant parameters identified in their database, i.e. t<sub>5</sub>-t<sub>2</sub> and cc<sub>3</sub>, to classify the embryos into four categories with a decreasing probability of euploid status (A to D).

### Embryo biopsy, genetic analysis and embryo transfer

Embryo biopsy was carried out on day 3 for all embryos with at least six blastomeres, less than 25% fragmentation and fair evenness. Embryos were first briefly placed in Ca/Mg-free medium (G-PGD, Vitrolife®) for a few minutes, before laser-assisted zona pellucida hatching (ZilosTK, Hamilton Thorn®, Beverly, MA, USA). One or two cells were then gently aspirated for subsequent genetic analysis depending on the number of blastomeres (one cell in six- to seven-cell embryos, two cells in embryos with eight or more cells). On average, 1.81 cells were removed per embryo. Each biopsied blastomere was lysed and the nucleus spread on a separate poly-L-lysine-coated slide. Interphase fluorescence in-situ hybridization (FISH) analyses were carried out according to the following procedures. The bacterial artificial chromosome contig probes covering 1 Mb of the subtelomeric region of the chromosomes involved in translocations were used to make FISH probes. All probes were directly labelled by nick translation with SpectrumOrange, SpectrumGreen and Diethylaminocoumarin fluorophores. First, slides were pretreated with a 0.05% pepsin solution at 37°C for 3 min to remove any remaining cytoplasmic proteins, followed by washing with PBS and serial ethanol dehydration. A mix containing 60–80 pg of probes was applied to each slide and sealed with rubber cement. Denaturation was carried out at 73°C for 3 min and hybridization at 37°C overnight. After hybridization, slides were washed in 2 × SSC/1%NP40 at 72°C for 2 min. The slides were then air-dried and mounted in Vectarshield (Vector Laboratories, USA) anti-fade medium containing 1 ng/ml 40,6-diaminidino-2-phenylindole to counterstain the nuclei. Slides were analysed under the fluorescence microscope. The FISH signals were counted following the criteria described by *Wilton et al. (2009)*.

Balanced embryos were selected for transfer on day 4 according to post-biopsy development for practical and organizational reasons. Indeed, many patients live far away from our PGT centre and remain close to the centre after ovum retrieval up to the time of embryo transfer. Therefore, embryo transfer is generally carried out as soon as possible (day 4) to allow patients to

return home quickly. Moreover, day-4 embryo transfers have been shown to perform as well as day-5 transfers (*Feil et al., 2008*). Single or double embryo transfer was chosen by a joint decision between medical staff and the couple. A pregnancy test was carried out 11 or 12 days after embryo transfer, and, if positive, clinical pregnancy was confirmed ultrasonographically 4–5 weeks later by the detection of a gestational sac and fetal heart activity.

### Statistics

Student's or Wilcoxon's tests were used for continuous variables and chi-squared or Fisher's tests for categorical variables. The non-parametric Mann–Whitney test was used for non-normally distributed variables. GraphPad Prism® software was used for statistical analysis.  $P < 0.05$  were considered to denote significant differences.

## RESULTS

### Study group

A total of 67 couples undergoing 105 PGT-SR cycles for chromosomal translocation were included in the analysis. Among them, 42 couples (62.7%) undergoing 71 cycles were referred for paternal chromosomal translocation, whereas 25 (37.3%) undergoing 34 cycles were referred for maternal translocation. The mean  $\pm$  SD female and male ages were  $32.0 \pm 3.6$  and  $34.26 \pm 4.87$  years, respectively. The mean  $\pm$  SD female BMI was  $24.3 \pm 4.2$  kg/m<sup>2</sup>. The average  $\pm$  SD total FSH dose was  $2511 \pm 967$  units. The average  $\pm$  SD number of mature oocytes collected was  $11.7 \pm 5.0$ . A total of 1176 oocytes were microinjected and cultured in the Embryoscope®, with 749 being normally fertilized (63.7%).

Among the 480 embryos undergoing blastomere biopsy on day 3, 190 (39.6%) had nine cells or more, 196 (40.8%) had eight cells, 66 (13.8%) had seven cells and 28 (5.8%) were at the six-cell stage. A total of 427 embryos (89%) could be analysed by FISH, with 177 displaying a balanced chromosomal status (41.5%) and 250 (58.5%) being unbalanced with various chromosomal patterns. No results could be obtained in 53 embryos (11%), because of the absence of nuclei, dubious results or technical problems. Significant differences were observed between balanced and unbalanced embryos for t5 ( $P = 0.0067$ ,

t9+ ( $P = 0.0077$ ), cc2 ( $P = 0.0144$ ), s2 ( $P = 0.0003$ ) and t5–t2 ( $P = 0.0028$ ) (TABLE 1), with t5 and t9+ occurring significantly earlier in unbalanced than in balanced embryos.

According to cell cycles and synchrony, cc2 and t5–t2 were significantly longer and s2 shorter in balanced than in unbalanced embryos. The classification of embryos inside or outside of the optimal range for each of these parameters (i.e. t5, t5–t2, cc2) based on quartiles (second and third quartiles represent the optimal range) did not allow us to identify relevant thresholds with acceptable sensitivity and specificity for the identification of balanced versus unbalanced embryos (Supplementary TABLE 1). Additionally, the frequency of multinucleation at the two- or four-cell stages (31.6% [ $n = 79$ ] versus 19.8% [ $n = 35$ ];  $P < 0.05$ ), abnormal division (32.8% [ $n = 82$ ] versus 11.3% [ $n = 20$ ];  $P < 0.05$ ) and cell exclusion at the morula stage (36.4% [ $n = 52$ ] versus 32.8% [ $n = 40$ ];  $P < 0.05$ ) was significantly higher in unbalanced embryos than in balanced embryos. The repartition of balanced and unbalanced embryos according to conventional morphological criteria is presented in Supplementary TABLE 2.

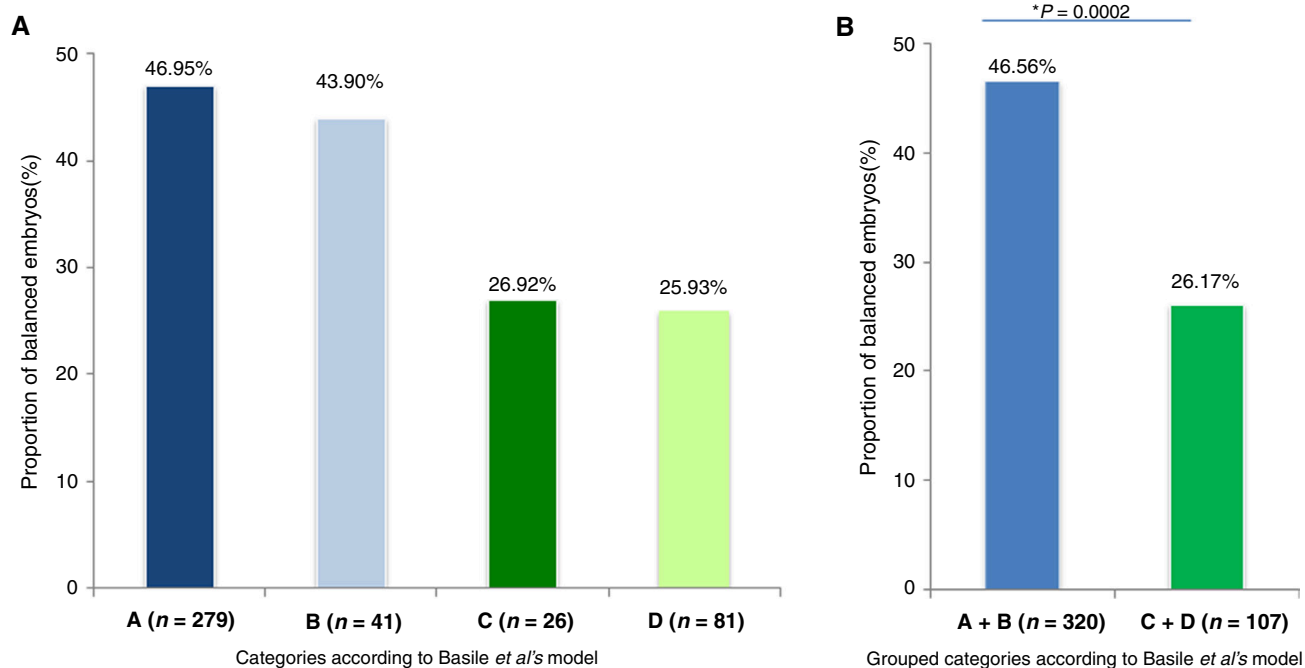
### Hierarchical classification of embryos according to Basile et al. (2014)

In the second phase, we tested the performance of the morphokinetic predictive model for embryo aneuploidy developed in a PGT-A population and published by *Basile et al. (2014)* in our PGT-SR population of couples with chromosomal rearrangements. The proportion of balanced embryos for the chromosomes involved in the translocation was not significantly different between the four groups (46.95%, 43.90%, 26.92% and 25.93%, respectively) (FIGURE 1A). As we observed a similar proportion of balanced embryos in groups A and B on the one hand and in groups C and D on the other, we tested the performance of a simplified model only, including the most significant morphokinetic variable in the original publication, i.e. the t5–t2 interval (FIGURE 1B). We found a significantly higher proportion of balanced embryos in the group [A + B] than in the group [C + D] (46.56% versus 26.17%, respectively) (FIGURE 1B). The performance of this simplified model, however, was low (sensitivity 47%,

**TABLE 1** MORPHOKINETIC PARAMETERS ACCORDING TO THE ABSENCE OR PRESENCE OF CHROMOSOMAL STRUCTURAL REARRANGEMENTS

	Balanced embryos (n = 177)		Unbalanced embryos (n = 250)		Significant P-values
	n	Mean ± SEM	n	Mean ± SEM	
tPB2	177	3.690 ± 0.1053	250	3.958 ± 0.1393	
tPNa	177	7.820 ± 0.1671	250	7.987 ± 0.1582	
tPNf	177	25.25 ± 0.2495	250	25.44 ± 0.2438	
T2	177	27.76 ± 0.2519	250	28.07 ± 0.2554	
T3	177	38.92 ± 0.3258	250	37.90 ± 0.3560	
T4	177	40.12 ± 0.3322	250	40.24 ± 0.3076	
T5	177	51.01 ± 0.4792	250	49.45 ± 0.4687	0.0067
T6	177	53.44 ± 0.4099	250	53.02 ± 0.4312	
T7	175	55.24 ± 0.4453	232	56.15 ± 0.5668	
T8	165	59.17 ± 0.8216	192	58.29 ± 0.7001	
T9+	144	73.99 ± 1.013	179	70.61 ± 1.011	0.0077
tPGT	177	69.87 ± 0.1207	250	70.01 ± 0.2372	
tSC	153	89.01 ± 0.7485	176	89.70 ± 0.7083	
tM	122	94.93 ± 0.8118	143	95.88 ± 0.8043	
tSB	93	103.6 ± 1.191	86	102.4 ± 1.099	
tB	56	111.0 ± 1.425	47	110.6 ± 1.447	
tEB	32	109.6 ± 1.916	25	112.0 ± 2.107	
T5-t2	177	23.25 ± 0.3989	250	21.38 ± 0.4203	0.0028
Cc2 (t3-t2)	177	11.16 ± 0.2155	250	9.829 ± 0.2768	0.0144
S2 (t4-t3)	177	1.195 ± 0.1934	250	2.343 ± 0.2488	0.0003

tB, timing of full blastocyst formation; tEB, timing of blastocyst expansion; tM, timing of fully compacted morula; tPB2, timing of extrusion of the second polar body; tPGT, timing of embryo biopsy for preimplantation genetic testing; tPNa, timing of appearance of pronuclei; tPNf, timing of pronuclei fading; tSB, timing of onset of blastocyst cavitation; tSC, timing of onset of compaction; t2 to t9+, timings of appearance of embryos with 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9 or more well-defined blastomeres.



**FIGURE 1** (A) Proportion of balanced embryos according to the four categories described in *Basile et al.'s model* (2014) and (B) after simplification into only two categories based on the most significant morphokinetic variable in the original publication, i.e. the t5-t2 interval.



specificity 73%, positive predictive value 84% and negative predictive value 32%).

## DISCUSSION

In this study, we showed that significant morphokinetic differences exist between balanced and unbalanced embryos in translocation carriers. No significant predictor of embryo chromosomal status, however, could be identified.

Although we did not screen embryo aneuploidy but only chromosomes involved in translocation for regulatory reasons, these findings are consistent with other studies (*Campbell et al., 2013a; Mumusoglu et al., 2017*), where the association between morphokinetic parameters and embryo ploidy status using PGT-A was evaluated. Indeed, these studies demonstrated that some morphokinetic parameters were significantly different between euploid and aneuploid embryos, either in the early stages of embryo development or during the later stages (*Campbell et al., 2013a; Mumusoglu et al., 2017*). The relevance and clinical value of this strategy, however, was questioned (*Rienzi et al., 2015; Minasi et al., 2016; Reignier et al., 2018*).

As PGT-A is not allowed in France, we tested this approach in patients undergoing PGT-SR cycles for chromosomal translocation to evaluate its predictive value for chromosomal balance. We found that two cell cleavages (t5 and t9+) occurred significantly earlier in unbalanced than in balanced embryos, and that some cellular intervals (cc2, s2, t5-t2) were significantly different between unbalanced and balanced embryos. A considerable overlap, however, existed between the distribution of these variables in unbalanced and balanced embryos. Nevertheless, we used the same approach as other investigators (*Basile et al., 2014*) based on quartiles to try to build a prediction model. The classification of embryos according to their morphokinetic optimal range did not allow us to generate a relevant classification tree. We defined the optimal range as the interval between the 25th and 75th percentile, i.e. quartiles 2 and 3.

We also tested the performance of a previously published aneuploidy prediction model based on two morphokinetic parameters in our dataset of PGT-SR cycles (*Basile et al., 2014*).

We found that the original version of this model had a low clinical value for the classification of balanced versus unbalanced embryos. A simplified version of the model, however, performed slightly better and allowed embryos to be grouped into two categories with significantly different chances of being balanced. The main explanation of these slightly different results probably lies within the different populations being considered. Indeed, we specifically included couples undergoing PGT because of chromosomal rearrangements in one of the partners, whereas *Basile et al. (2014)* included patients undergoing PGT-A for recurrent miscarriage and repeated implantation. Moreover, we could only look at the chromosomes involved in the translocation, not others, for regulatory reasons. Although it has been largely reported that a significant proportion of embryos obtained from translocation carriers have chromosome imbalances unrelated to the rearrangement carried in the couple (*Alfarawati et al., 2011; Fiorentino et al., 2011*), we were prevented from extensively evaluating embryo chromosomal status, whereas *Basile et al. (2014)* carried out PGT-A analysis on all 46 chromosomes. Interestingly, in our previously published validation study aimed at evaluating the performance of a pregnancy prediction model based on morphokinetic parameters, we found that a simplified version of the model performed significantly better than the original one (*Fréour et al., 2015*). In both cases, the difference in atmosphere, i.e. low versus atmospheric oxygen pressure, could partly explain these slight discrepancies.

Among the several studies dealing with time-lapse in IVF, some advocated the value of this technique as a deselection tool used to discard embryos with very poor implantation potential rather than a selection tool for the embryos with a high probability of implantation (*Rubio et al., 2012; Liu et al., 2015; Zhan et al., 2016*). For instance, direct cleavage has been reported to be a strong predictor of implantation failure (*Rubio et al., 2012; Zhan et al., 2016*), depending on the cellular stage in which it occurred. Although this remains debated, multinucleation was also reported to be detrimental for implantation (*Aguilar et al., 2016; Desch et al., 2017*). In this study, we found that the frequency of multinucleation at the two- or four-

cell stage and abnormal division was significantly higher in unbalanced than in balanced embryos. Whether these abnormal events should be included in a hierarchical classification tree should be tested in further studies. We also observed that cell exclusion at the morula stage was slightly more frequent in unbalanced than in balanced embryos. A recent study of interest evaluated the chromosomal status of these excluded cells and demonstrated that they were more frequently aneuploid than the corresponding blastocysts, suggesting a possible cellular repair mechanism aiming at lowering the aneuploidy rate (*Lagalla et al., 2017*). These preliminary results, however, remain to be confirmed in further studies to determine whether the cell exclusion phenomenon and its pattern should be considered as an indicator of embryo ploidy.

Among the studies evaluating the value of time-lapse as a predictor of embryo ploidy, some were based on the day-3 embryo biopsy (*Basile et al., 2014; Chawla et al., 2015; Del Carmen Nogales et al., 2017*), whereas others used trophectoderm biopsy (*Campbell et al., 2013a; 2013b; Rienzi et al., 2015; Minasi et al., 2016; Mumusoglu et al., 2017*). The advantages of trophectoderm biopsy, such as the higher number of cells and amount of DNA required for analysis and increased euploidy rate in fewer embryos (*Scott et al., 2013*), account for the observed trend towards its increasing use in PGT centres, even though the advantages and pitfalls of embryo biopsy still remain to be deciphered (*Zacchini et al., 2017*). In parallel, some studies have advocated the value of late morphokinetic parameters at the blastocyst stage rather than early ones at the cleavage stage as predictors of embryo ploidy (*Campbell et al., 2013a; 2013b*). Although we recently implemented blastocyst biopsy for PGT-SR, the number of cycles at the time of this study was insufficient to compare with the day-3 biopsy strategy. Therefore, our study should be repeated in a large number of translocation carriers undergoing PGT-SR with trophectoderm biopsy to determine whether late morphokinetic parameters can help to identify balanced embryos and test the relevance of previously published models in this population.

The main limitation of our study is that we could only compare balanced

and unbalanced embryos for specific chromosome rearrangements because of French law. Any attempt to generalize the results to aneuploidy screening should be made with great care. Another limitation lies within the use of FISH for the assessment of chromosomal status. We acknowledge that this technique suffers from some limitations (Fiorentino *et al.*, 2011; Dahdouh *et al.*, 2015), exposing a risk of classification error and uninterpretable results (11% of biopsied embryos in this cohort had uninterpretable results). The most critical factors for FISH accuracy are quality of cell fixation, probe hybridization, signal overlap and subjective signal scoring. Our operators, however, were experienced, thus limiting this potential bias. Finally, the retrospective design of this study exposes a risk of bias and prevents the appropriate number of patients for proper statistical power to be calculated.

In conclusion, we found some significant morphokinetic differences between balanced and unbalanced embryos in couples undergoing PGT-SR for chromosomal translocation. The considerable overlap, however, between the variables did not allow the identification of relevant predictors of embryo chromosomal status, as reported previously. We have also shown that a previously published time-lapse model developed for embryo aneuploidy prediction was interesting but had a relatively low performance in our PGT-SR population. The exact clinical value of time-lapse in improving the selection of embryos with low probability of chromosomal abnormality remains to be confirmed.

## SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.rbmo.2018.11.006.

## REFERENCES

- Aguilar, J., Rubio, I., Muñoz, E., Pellicer, A., Meseguer, M. **Study of nucleation status in the second cell cycle of human embryo and its impact on implantation rate.** *Fertil. Steril* 2016; 106: 291-299.e2
- Alfarawati, S., Fragouli, E., Colls, P., Wells, D. **First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis.** *Hum. Reprod.* 2011; 26: 1560-1574
- Barrie, A., Homburg, R., McDowell, G., Brown, J., Kingsland, C., Troup, S. **Examining the efficacy of six published time-lapse imaging embryo selection algorithms to predict implantation to demonstrate the need for the development of specific, in-house morphokinetic selection algorithms.** *Fertil. Steril* 2017; 107: 613-621
- Basile, N., Nogales, M., del, C., Bronet, F., Florensa, M., Riqueiros, M., Rodrigo, L., García-Velasco, J., Meseguer, M. **Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis.** *Fertil. Steril* 2014; 101: 699-704
- Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., Hickman, C.F.L. **Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics.** *Reprod. Biomed. Online* 2013a; 26: 477-485
- Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., Thornton, S. **Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS.** *Reprod. Biomed. Online* 2013b; 27: 140-146
- Capalbo, A., Romanelli, V., Cimadomo, D., Girardi, L., Stoppa, M., Dovere, L., Dell'Edera, D., Ubaldi, F.M., Rienzi, L. **Implementing PGD/PGD-A in IVF clinics: considerations for the best laboratory approach and management.** *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016a; 33: 1279-1286
- Capalbo, A., Rienzi, L., Ubaldi, F.M. **New approaches for multifactor preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases and aneuploidies from a single biopsy.** *Fertil. Steril* 2016b; 105: 297-298
- Chawla, M., Fakhri, M., Shunnar, A., Bayram, A., Hellani, A., Perumal, V., Divakaran, J., Budak, E. **Morphokinetic analysis of cleavage stage embryos and its relationship to aneuploidy in a retrospective time-lapse imaging study.** *J. Assist. Reprod. Genet.* 2015; 32: 69-75
- Ciray, H.N., Campbell, A., Agerholm, I.E., Aguilar, J., Chamayou, S., Esbert, M., Sayed, S., Time-Lapse User Group. **Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group.** *Hum. Reprod.* 2014; 29: 2650-2660
- Dahdouh, E.M., Balayla, J., García-Velasco, J.A. **Comprehensive chromosome screening improves embryo selection: a meta-analysis.** *Fertil. Steril* 2015; 104: 1503-1512
- Del Carmen Nogales, M., Bronet, F., Basile, N., Martínez, E.M., Liñán, A., Rodrigo, L., Meseguer, M. **Type of chromosome abnormality affects embryo morphology dynamics.** *Fertil. Steril* 2017; 107: 229-235.e2
- 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
- Feil, D., Henshaw, R.C., Lane, M. **Day 4 embryo selection is equal to Day 5 using a new embryo scoring system validated in single embryo transfers.** *Hum. Reprod.* 2008; 23: 1505-1510
- Fiorentino, F., Spizzichino, L., Bono, S., Biricik, A., Kokkali, G., Rienzi, L., Ubaldi, F.M., Iammarrone, E., Gordon, A., Pantos, K. **PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization.** *Hum. Reprod.* 2011; 26: 1925-1935
- Fréour, T., Le Fleuter, N., Lammers, J., Splingart, C., Reignier, A., Barrière, P. **External validation of a time-lapse prediction model.** *Fertil. Steril* 2015; 103: 917-922
- Harton, G.L., Harper, J.C., Coonen, E., Pehlivan, T., Vesela, K., Wilton, L., European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium. **ESHRE PGD consortium best practice guidelines for fluorescence in situ hybridization-based PGD.** *Hum. Reprod.* 2011; 26: 25-32
- Lagalla, C., Tarozzi, N., Sciajno, R., Wells, D., Di Santo, M., Nadalini, M., Distratis, V., Borini, A. **Embryos with morphokinetic abnormalities may develop into euploid blastocysts.** *Reprod. Biomed. Online* 2017; 34: 137-146
- Liu, Y., Chapple, V., Feenan, K., Roberts, P., Matson, P. **Clinical significance of intercellular contact at the four-cell stage of human embryos, and the use of abnormal cleavage patterns to identify embryos with low implantation potential: a time-lapse study.** *Fertil. Steril* 2015; 103: 1485-1491.e1
- Minasi, M.G., Colasante, A., Riccio, T., Ruberti, A., Casciani, V., Scarselli, F., Spinella, F., Fiorentino, F., Varricchio, M.T., Greco, E. **Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study.** *Hum. Reprod.* 2016; 31: 2245-2254
- Mumusoglu, S., Yarali, I., Bozdog, G., Ozdemir, P., Polat, M., Sokmensuer, L.K., Yarali, H. **Time-lapse morphokinetic assessment has low to moderate ability to predict euploidy when patient- and ovarian stimulation-related factors are taken into account with the use of clustered data analysis.** *Fertil. Steril* 2017; 107: 413-421.e4
- Reignier, A., Lammers, J., Barrière, P., Freour, T. **Can time-lapse parameters predict embryo ploidy? A systematic review.** *Reprod Biomed Online* 2018; 36: 380-387
- Rienzi, L., Capalbo, A., Stoppa, M., Romano, S., Maggiulli, R., Albricci, L., Scarica, C., Farcomeni, A., Vajta, G., Ubaldi, F.M. **No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study.** *Reprod. Biomed. Online* 2015; 30: 57-66
- Rubio, I., Kuhlmann, R., Agerholm, I., Kirk, J., Herrero, J., Escribá, M.-J., Bellver, J., Meseguer, M. **Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study.** *Fertil. Steril* 2012; 98: 1458-1463
- Scott, R.T.Jr., Upham, K.M., Forman, E.J., Zhao, T., Treff, N.R. **Cleavage-stage biopsy significantly**

- impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial.** *Fertil Steril* 2013; 100: 624–630
- Tobler, K.J., Brezina, P.R., Benner, A.T., Du, L., Xu, X., Kearns, W.G. **Two different microarray technologies for preimplantation genetic diagnosis and screening, due to reciprocal translocation imbalances, demonstrate equivalent euploidy and clinical pregnancy rates.** *J. Assist. Reprod. Genet.* 2014; 31: 843–850
- Wilton, L., Thornhill, A., Traeger-Synodinos, J., Sermon, K.D., Harper, J.C. **The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD.** *Hum. Reprod.* 2009; 24: 1221–1228
- Zacchini, F., Arena, R., Abramik, A., Ptak, G.E. **Embryo biopsy and development: the known and the unknown.** *Reproduction* 2017; 154: R143–R148
- Zhan, Q., Ye, Z., Clarke, R., Rosenwaks, Z., Zaninovic, N. **Direct Unequal Cleavages: Embryo Developmental Competence, Genetic Constitution and Clinical Outcome.** *PLoS One* 2016; 11:e0166398

Received 3 January 2018; received in revised form 8 November 2018; accepted 9 November 2018.

## C] Annotation automatisée des paramètres morphocinétiques

Cette première partie du projet s'est attachée à étudier la morphocinétique embryonnaire comme marqueur non invasif du potentiel implantatoire embryonnaire et de la ploïdie embryonnaire. Alors que de nombreuses études décrivent un lien entre la morphocinétique embryonnaire et les chances de grossesse et que plusieurs modèles prédictifs semblent fiables lorsqu'ils sont utilisés dans le centre où ils ont été élaborés, il ne semble exister à ce jour aucun modèle universellement applicable et avec un pouvoir suffisamment discriminatif (80). Une des hypothèses levées et pouvant expliquer l'absence de validation externe des modèles prédictifs publiés, ou le faible pouvoir prédictif des modèles universels est la forte hétérogénéité des populations étudiées dans ces différentes études. Par exemple, il a été montré qu'un même modèle n'était pas du tout prédictif lorsqu'appliqué à une population ayant recours au don d'ovocyte, alors que prédictif dans la population infertile d'un même centre (81). De plus, au-delà des procédures de laboratoires pouvant varier entre les centres, l'annotation manuelle de la morphocinétique embryonnaire peut être à l'origine d'une grande variabilité de résultats entre les opérateurs. Malgré l'existence d'une nomenclature précise (82) et de recommandations internationales (83), il est reconnu qu'une forte variabilité inter opérateurs entre un même centre ou entre des centres différents existe (84).

Une réponse possible à la problématique rencontrée réside dans l'étude de très grandes populations, de façon prospective et randomisée (85), permettant ainsi de s'affranchir des différences observées dans les faibles effectifs. De même, une standardisation de l'annotation des paramètres morphocinétiques et une bonne reproductibilité dans cette annotation permettrait une analyse comparative de données multicentriques beaucoup plus fiable qu'actuellement.

Notre réponse à ces deux problématiques réside dans l'automatisation de l'annotation de la morphocinétique. Nous avons ainsi développé un outil d'annotation automatisée, permettant l'annotation rapide et reproductible de données multicentriques et prospectives.

## Article 5

### **Development of automated annotation software for human embryo morphokinetics**

Résumé détaillé en français

**QUESTION :** Est-ce possible de développer un outil d'annotation automatisée du développement embryonnaire humain grâce à l'analyse d'image avec un système time-lapse ?

**INTRODUCTION :** Les paramètres morphocinétiques obtenus grâce à l'utilisation des systèmes time-lapse sont de plus en plus utilisés pour évaluer la qualité embryonnaire. Cependant, l'annotation manuelle de ces paramètres est très chronophage et opérateur dépendante. Il devient primordial de développer des approches totalement automatisées de cette annotation

**MATERIEL ET METHODES :** Cette étude monocentrique a été réalisée à partir de 701 vidéos provenant de 584 couples suivant un parcours de FIV avec culture embryonnaire dans un système time-lapse. Le seul critère de sélection était la durée de la vidéo qui devait être d'au minimum 60h. Un outil d'annotation morphocinétique automatisé a été développé sur la base du coefficient de variation des niveaux de gris et de la détection de l'amincissement de la zone pellucide. La détection des événements du développement embryonnaires obtenue à l'aide de l'outil automatisé était comparée à celle obtenue manuellement par des embryologistes entraînés.

**RESULTATS :** Bien que quelques différences aient été observées à un niveau individuel, nous avons observé une concordance globale entre l'annotation automatisée et l'annotation manuelle de la morphocinétique embryonnaire humaine depuis la fécondation jusqu'au stade de blastocyste expansé ( $r^2 = 0.92$ ).

**LIMITATIONS :** Ces résultats devraient être testés de façon multicentrique pour confirmer la performance de l'outil d'annotation automatisée. L'accès aux images en 3 dimensions augmenterait sa précision.

**PERSPECTIVES :** Notre système permet l'analyse de grandes bases de données multicentriques, permettant ainsi l'éventuelle détection de nouveaux marqueurs morphocinétiques de la qualité embryonnaire et du potentiel implantatoire.

# Development of automated annotation software for human embryo morphokinetics

M. Feyeux<sup>1,3,†</sup>, A. Reignier<sup>1,2,†</sup>, M. Mocaer<sup>1</sup>, J. Lammers<sup>1,2</sup>,  
D. Meistermann<sup>1</sup>, P. Barrière<sup>1,2</sup>, P. Paul-Gilloteaux<sup>3,§</sup>, L. David<sup>1,3,§</sup>, and  
T. Fréour<sup>1,2,\*,§</sup>

<sup>1</sup>Nantes Université, Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et immunologie, Unité mixte de recherche I064, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie, F-44000 Nantes, France <sup>2</sup>Service de Médecine et Biologie du Développement et de la Reproduction, CHU Nantes, Nantes Université, Nantes, France <sup>3</sup>Université de Nantes, Centre Hospitalier Universitaire Nantes, Inserm, CNRS, Structure Fédérative de Recherche en Santé Santé, Inserm Unité Mixte de Service 016, CNRS UMS 3556, F-44000 Nantes, France

\*Correspondence address. Service de Médecine et Biologie du Développement et de la Reproduction, CHU de Nantes, 38 Boulevard Jean Monnet, Nantes, France. Tel: +33-240083234; Fax: +33-240083228; E-mail: thomas.freour@chu-nantes.fr

Submitted on August 7, 2019; resubmitted on December 26, 2019; editorial decision on January 9, 2020

**STUDY QUESTION:** Is it possible to develop an automated annotation tool for human embryo development in time-lapse devices based on image analysis?

**SUMMARY ANSWER:** We developed and validated an automated software for the annotation of human embryo morphokinetic parameters, having a good concordance with expert manual annotation on 701 time-lapse videos.

**WHAT IS KNOWN ALREADY:** Morphokinetic parameters obtained with time-lapse devices are increasingly used for the assessment of human embryo quality. However, their annotation is time-consuming and can be slightly operator-dependent, highlighting the need to develop fully automated approaches.

**STUDY DESIGN, SIZE, DURATION:** This monocentric study was conducted on 701 videos originating from 584 couples undergoing IVF with embryo culture in a time-lapse device. The only selection criterion was that the duration of the video must be over 60 h.

**PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS:** An automated morphokinetic annotation tool was developed based on gray level coefficient of variation and detection of the thickness of the zona pellucida. The detection of cellular events obtained with the automated tool was compared with those obtained manually by trained experts in clinical settings.

**MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE:** Although some differences were found when embryos were considered individually, we found an overall concordance between automated and manual annotation of human embryo morphokinetics from fertilization to expanded blastocyst stage ( $r^2 = 0.92$ ).

**LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION:** These results should undergo multicentric external evaluation in order to test the overall performance of the annotation tool. Getting access to the export of 3D videos would enhance the quality of the correlation with the same algorithm and its extension to the 3D regions of interest. A technical limitation of our work lies within the duration of the video. The more embryo stages the video contains, the more information the script has to identify them correctly.

**WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS:** Our system paves the way for high-throughput analysis of multicentric morphokinetic databases, providing new insights into the clinical value of morphokinetics as a predictor of embryo quality and implantation.

**STUDY FUNDING/COMPETING INTEREST(S):** This study was partly funded by Finox-Gedeon Richter Forward Grant 2016 and NeXT (ANR-16-IDEX-0007). We have no conflict of interests to declare.

**TRIAL REGISTRATION NUMBER:** N/A

**Key words:** IVF / time-lapse imaging / automation / morphokinetics / computer-assisted diagnosis / embryonic development / embryo culture techniques

<sup>†</sup>The authors consider that the first two authors should be regarded as joint first authors.

<sup>§</sup>The authors consider that the last three authors should be regarded as senior authors.

## Introduction

IVF has greatly improved over the past two decades. However, success rates are still not optimal and often variable across centers and countries, with multiple pregnancies still being an issue (European IVF-monitoring Consortium et al., 2017). This situation is partially explained by the current limitations of embryo quality assessment methods. In fact, morphological assessment remains the most common method to evaluate embryo implantation potential and still suffers from a lack of predictive power despite the implementation of well-defined consensus guidelines (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Although embryo morphology on the day of transfer has been shown to be correlated with the outcome of the IVF cycle (Rhenman et al., 2015), it has also been demonstrated that this evaluation suffered from a lack of inter- and intra-observer reproducibility (Paternot et al., 2009) and was not correlated to embryo ploidy (Capalbo et al., 2014).

Promoting single embryo transfer implies the availability of accurate and relevant strategies to identify embryos with the best chance to implant (Kushnir et al., 2017). Various technologies, either invasive or non-invasive, have been developed over the past decade in order to improve embryo quality assessment *in vitro*, such as preimplantation genetic testing (Gardner et al., 2015) or metabolomics (Sanchez et al., 2017) with encouraging results, but also with some limitations such as cost, regulatory constraints and lack of clinical validation.

Time-lapse monitoring (TLM) systems allow continuous and dynamic annotation of individual embryo development while maintaining optimal culture conditions (Basile et al., 2015; Castelló et al., 2016), bringing opportunities for personalized medicine approaches in IVF. The data generated are called morphokinetic parameters, as they combine morphological features and kinetic evaluation of embryo development. Since the first commercial devices became available in 2010, this technology has been implemented in many IVF laboratories for routine embryo culture and selection. It was recently reported that 17% of the US IVF laboratories possessed at least one TLM system in 2017 (Dolinko et al., 2017). This promising technology aims at correlating morphological features and kinetic parameters, such as the timing of cellular cleavages or intervals, with embryo implantation potential (Ciray et al., 2014). To date, eight randomized controlled trials have evaluated the relevance of using morphokinetic parameters to select the embryo with the best chance of achieving pregnancy, with various results, in line with heterogeneous design and outcomes (Armstrong et al., 2018).

Most TLM systems allow the individual monitoring of embryo development and its manual annotation. Thus, trained operators have to regularly annotate morphokinetic parameters for each embryo in culture, which can be time-consuming, depending on the number of cultured embryos and on the number of morphokinetic parameters annotated for each embryo. Moreover, the manual annotation of embryo developmental events can be impacted by inter-operator and inter-laboratory variability (Chen et al., 2013; Sundvall et al., 2013; Martínez-Granados et al., 2017), preventing robust and high-throughput, multicentric database analysis. However, embryo annotations through TLM systems continue to be performed manually and suffer from the same inter-operator variability as microscopic observation (Martínez-Granados et al., 2017). In addition, the type of TLM system can contribute to increasing embryo annotation discrepancies. Automated

annotation of embryo morphokinetic parameters could theoretically tackle these two issues, leading to improved workflow, high-throughput analysis and lower subjectivity. To our knowledge, only one pilot study reported the setup of a semi-automated script based on image analysis annotating of embryo morphokinetic parameters in humans (Mölder et al., 2015). This script was, however, tested on a very limited population (39 embryos) and was limited to a proof of concept. Here, we have improved the method and enhanced its robustness and detection power.

The purpose of this study was to test the performance of a new fully automated tool (called 'Kinetembryo') for the annotation of embryo morphokinetic parameters obtained with a commercially available time-lapse incubation device on human embryos.

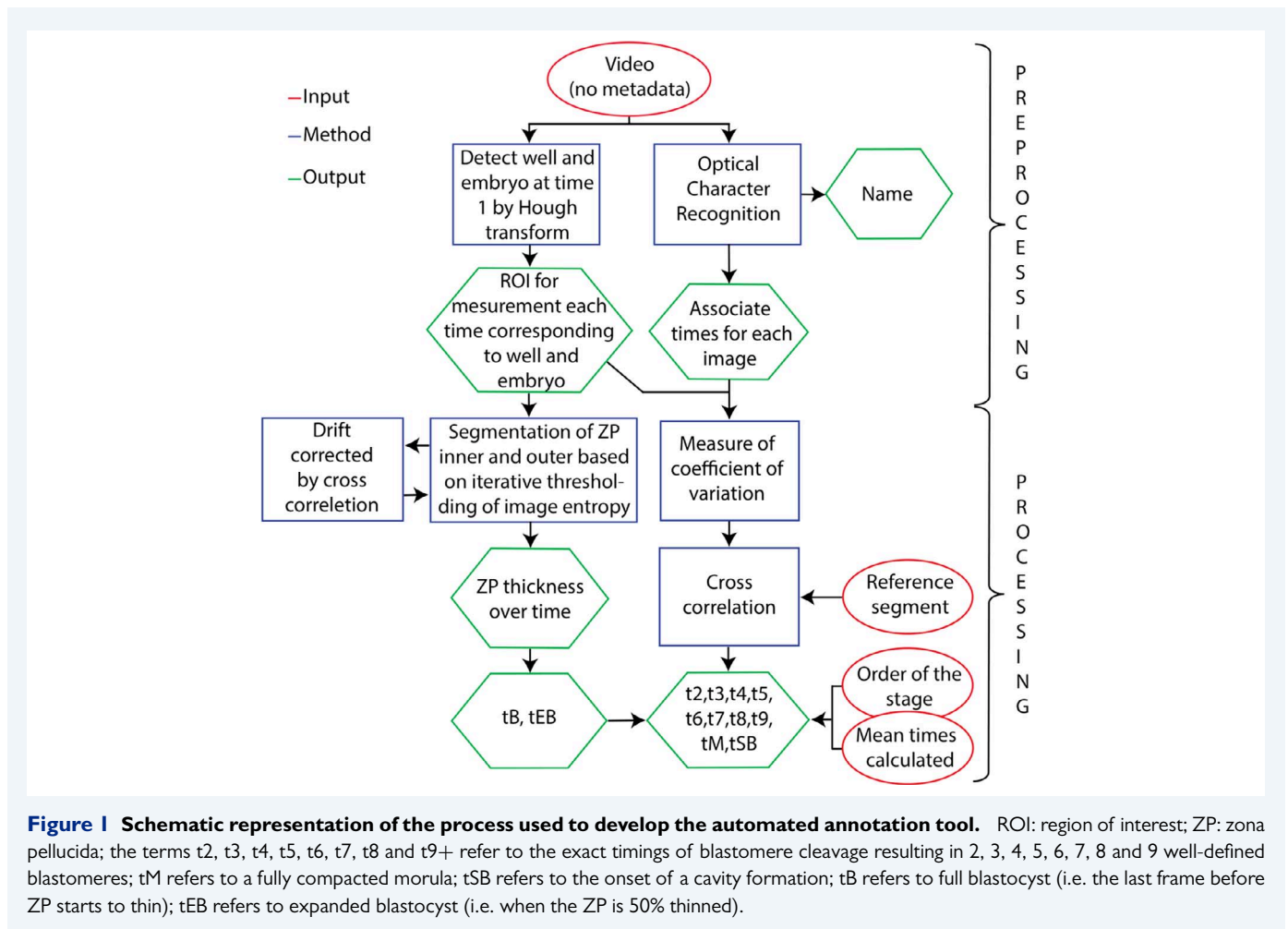
## Materials and Methods

### Design

This monocentric study was conducted in a university-based fertility center with data from unselected couples referred for ICSI and whose embryos were cultured in the Embryoscope® (Vitrolife, Sweden) between 16 February 2011 and 01 January 2017. The videos of embryo development used in this study were randomly extracted from the database. The only selection criterion was the duration of the video that must be over 60 h. In order to evaluate the performance of our method and software, we compared the morphokinetic annotation performed manually, as detailed below, with the automatic output of Kinetembryo on the same videos. All patients gave their consent for anonymous use of their data registered in this database. This project was approved by the local Institutional Review Board (Groupe Nantais d'Ethique dans le Domaine de la Santé). All patients underwent controlled ovarian stimulation with an antagonist protocol, as described in a previous study (Fréour et al., 2015).

### Embryology procedures

ICSI and embryo culture were performed as described previously (Fréour et al., 2015) at 37°C under controlled atmosphere with low oxygen pressure (5% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub>). Sequential media were used for embryo culture (G1plus® and G2plus®, Vitrolife). Images were captured on seven focal planes at 10 min intervals using a Hoffman modulation contrast optical setup (Hoffman, 1977) and a 635 nm LED as light source as provided in the Embryoscope®. The resolution of the camera is 1280 × 1024 pixels. Two embryologists, who had already performed most of the embryo annotations at this center, retrospectively re-annotated all database entries since 2011 strictly according to Ciray et al. (2014). In order to harmonize annotation, this re-annotation was performed by the two embryologists at the same time, agreeing between themselves for all the annotation points. They re-annotated hundreds of videos in duet before prospectively and separately annotating the new cycles. As an internal quality control process, both embryologists annotated the same 10 videos and compared their results every 3 months. In case of more than 20 minutes (two images) discrepancy in the results, the videos were watched again and discussed in detail in order to keep inter-operator variability as low as possible. The term tPNf was used to describe pronuclei fading. The terms t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8 and t9<sup>+</sup> were, respectively, used for



exact timings of blastomere cleavage resulting in 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9 well-defined blastomeres. The term tM referred to a fully compacted morula. At the blastocyst stage, tSB was used to describe the onset of a cavity formation, tB was used for full blastocyst, i.e. the last frame before the zona pellucida (ZP) starts to thin and tEB for expanded blastocyst, i.e. when the ZP is 50% thinned.

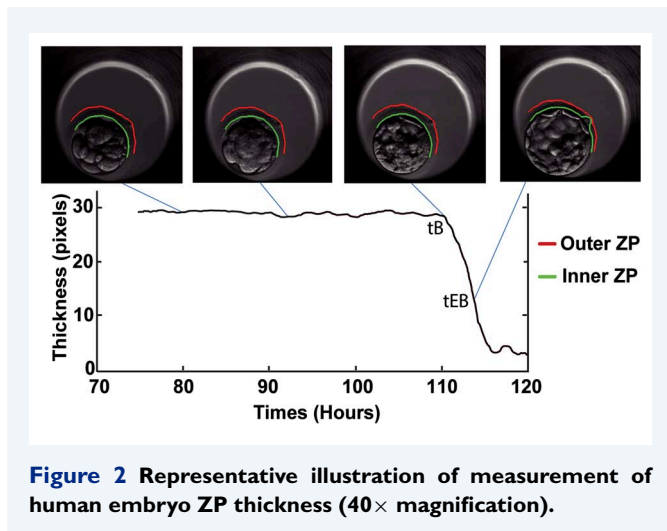
## Development of an automated annotation tool

The pipeline that we propose mainly consists of two steps: a preprocessing step and an automatic annotation (processing) step (Fig. 1). It was implemented as a stand-alone software written with Matlab®, the mathworks® (Natick, MA, USA), R2016a, with the image processing and the parallel toolboxes. The input of the pipeline is the videos generated by the TLM system, in our case the Embryoscope®, which are 2D videos taken in the optimal in-focus plane of acquisition. The preprocessing step consists of extracting metadata and region of interest (ROI). Note that the video reference name and acquisition times are directly printed on the videos. For this reason, Kinetembryo first propose an optical character recognition to extract the exact time of each frame of the video and the reference name of the video. The ROI for the measurement are then automatically extracted on the first frame: the well and the embryo cell are detected automatically by

Hough transform. The position of this ROI is then tracked over time by image cross correlation in order to correct for any drift.

The annotation step consisted of two main tasks. The first task allowed detection of tB and tEB. The ZP was segmented by an iterative automatic bi-thresholding method applied to the entropy image of each frame. This entropy-based segmentation allowed the operator to identify the inner and outer ZP, and consequently to track its thickness over time. Based on the expert definition (Ciray *et al.*, 2014) of tB and tEB, these two stage time points can then be automatically derived from the ZP thickness curve (Fig. 2). The second task consists of identifying earlier events, i.e. t1–t9, tM and tSB. The approach used for automated detection of cellular cleavages was inspired from a recent study that used the standard deviation of normalized gray levels of images as descriptors of embryo content (Mölder *et al.*, 2015). In our work, we measured the gray-level coefficient of variation (CV) of intensity into the tracked embryo ROI, giving a curve of variation over time (Fig. 3). The different key stages of embryo development are derived from this curve. First, we created a template curve of gray-level CV based on the mean of three curves obtained with reference videos, i.e. regular and ideal embryo development, no fragmentation, no variation of luminosity, no shift in embryo position. As the same template curve was used for the analysis of all videos and the algorithm has no stochastic aspect, the same code launched on the same data is always reproducible and gives the same result. Every stage of interest was then looked for



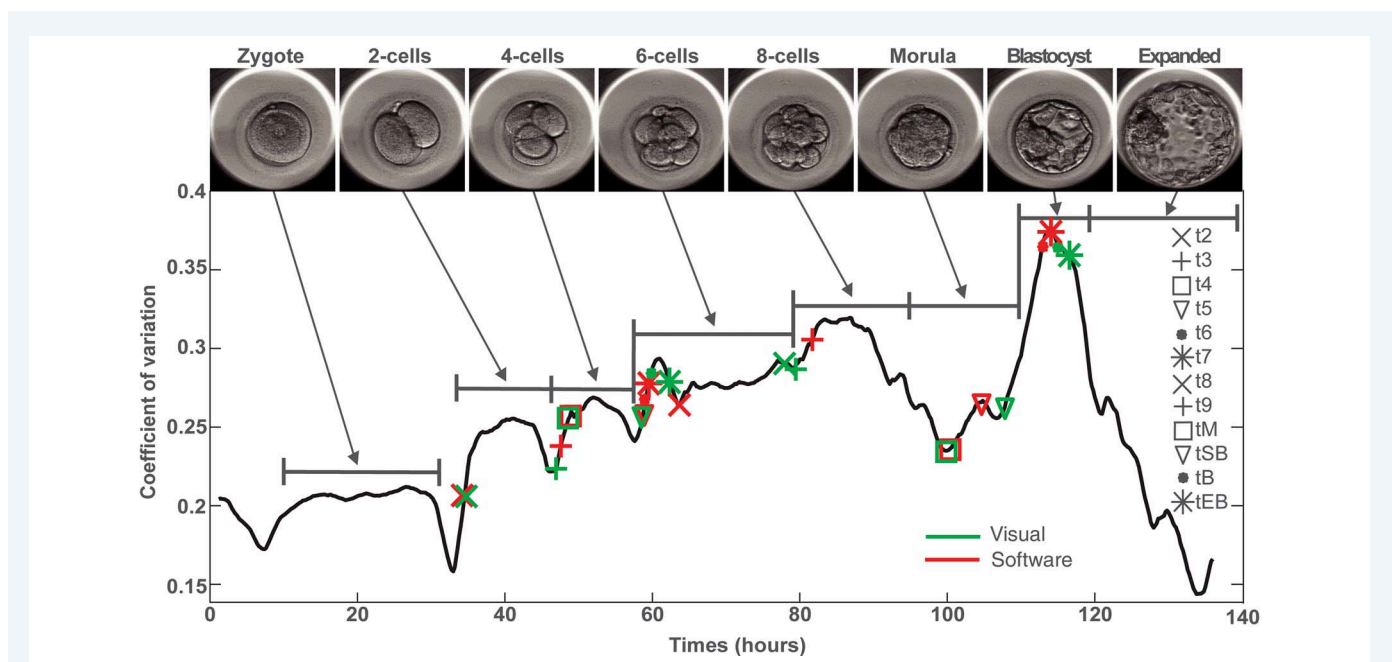


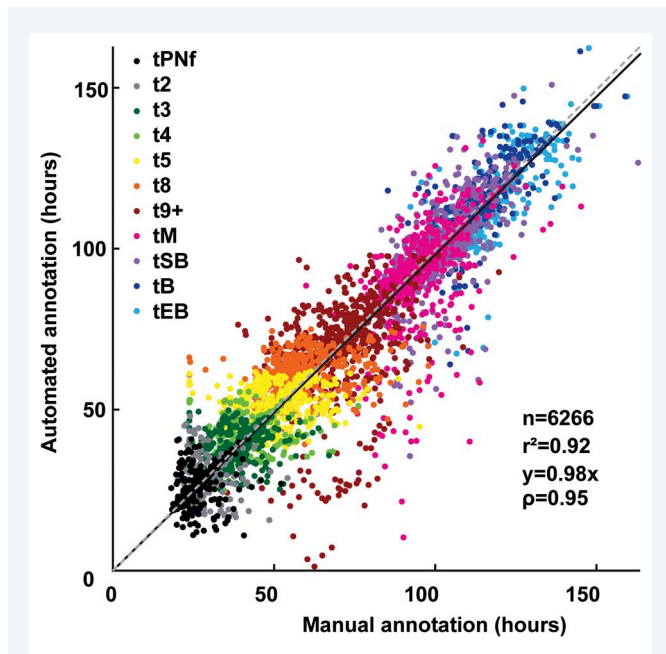
by cross-correlating the part of the template corresponding to the stage of interest within a search windows corresponding to average time  $\pm 3$  SD calculated for a database of measurements on 16 000 embryos annotated in our local database. For example, the search of t2 was constrained on a window centered at 30 hours post-fertilization  $\pm 24$  hours, since standard deviation was 8 hours. A global optimization of the cross correlation was then performed based on the knowledge of stage ordering and shape of the curve. The biological and mathematical rules used in the software are listed in the [Supplementary Data](#). A metric measure by statistical analysis was used to exclude very bad quality images, such as blurred images and the ones with insufficient brightness.

### Validation of the automated annotation tool

In order to test the performance and the accuracy of this automated analysis process, we compared the results with the timings recorded by two users on a first set of 78 training videos before a validation step performed on a larger set of 701 individual videos (including the first 78 videos) extracted from the Embryoscope®. The video frames ranged from a minimum of zygote stage to a maximum of hatched blastocyst stage, including starting points at cleavage stage (thawed embryos) and chaotic developments. The normal distribution of the data was tested and rejected with the Shapiro–Wilk test. In order to evaluate concordance between software measures and expert measures and their reliability, the intra-class correlation coefficient (ICC) was calculated. The ICC form was chosen according to [Koo and Li \(2016\)](#). The ICC estimates and their 95% CI were calculated based on absolute agreement, using mixed effects and random effects models. [Fleiss \(1981\)](#) categorized the ICC values as follows: poor ( $<0.5$ ), moderate (0.5–0.75), good (0.75–0.9) and excellent ( $>0.9$ ) reliability. Bland–Altman curves with 95% concordance limits (mean difference  $\pm 1.96$  SD of the difference) were created for the measurement pairs in order to evaluate the agreement between the techniques ([Supplementary Fig. S1](#)). In order to evaluate the values of standard deviation that we observed between manual and automated annotations, they were compared with standard deviation values reported in a Spanish external quality control of time-lapse annotation program ([Martínez-Granados et al., 2017](#)). The same analysis was then performed on 600 videos with more typical embryo development, excluding chaotic development, videos starting at the cleavage stage and videos with a high degree of fragmentation.

All statistical analysis was performed with GraphPad Prism software (GraphPad Software Company, San Diego, CA, USA). A *P*-value below 0.05 was considered to be significant.





**Figure 4** Performance test of the automated annotation tool, as reflected by correlation analysis between automated and expert manual morphokinetic annotation of the full development of 701 human embryos monitored with a time-lapse device.

## Results

We tested the robustness of the software on 701 videos of embryos. For each video, the time associated with the beginning of a stage obtained by automated or manual annotation was used (Fig. 4). When comparing both annotation methods, an overall significant correlation with a  $R^2$  value of 0.92 was found, supporting the high degree of sensitivity of the Kinetembryo tool. Time of processing on a personal computer was, on average, 20 minutes and did not require any external intervention, allowing batching all the videos together. Note that the code has been parallelized on the data, meaning that when run on several processors, several videos were processed in parallel, thus reducing the total processing time. The median timing, acceptable range of standard deviation according to Martínez-Granados *et al.* (2017) and ICC for each developmental stage are presented in Fig. 5. Pronuclei fading was correctly annotated according to the recently published acceptable values of standard deviation for manual morphokinetic annotation (Fig. 5) (Martínez-Granados *et al.*, 2017). The ICC showed a poor correlation ( $ICC=0.445$ ) overall between manual and automated annotations but a good correlation for this stage for the best 600 videos ( $ICC=0.758$ ). Kinetembryo was able to correctly annotate most of the first two mitotic divisions (2-cell to 4-cell stages) videos (Fig. 5). At the end, mean cleavage timings detected by automated annotation showed poor or moderate correlation with manual annotation ( $ICC < 0.75$ ) (Fig. 5). The fully compacted morula stage was well detected by Kinetembryo in 82.6% of the samples. The following steps of blastulation (tSB, tB and tEB) were also accurately annotated by Kinetembryo. ICC showed a poor and fair correlation for tM

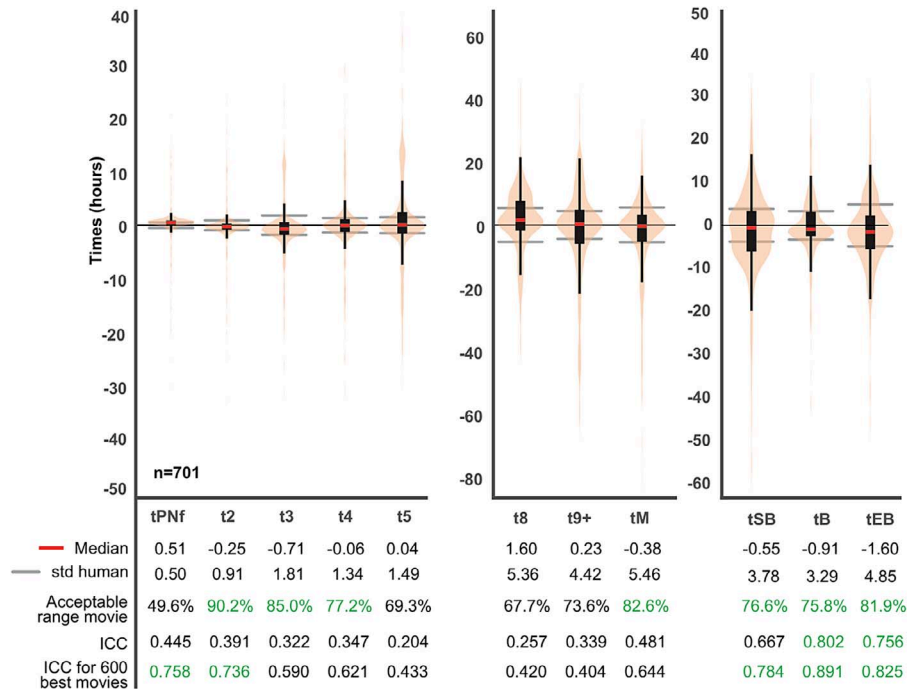
but fair and good correlations for the blastocyst stage (Fig. 5). No systematic automated annotation error was observed, as demonstrated by Bland–Altman plots (Supplementary Fig. S1). Examples of typical accurate (upper part) and inaccurate (lower part) annotations for human embryo development are provided (Supplementary Fig. S2).

No statistically significant difference was observed when videos with an image capture frequency of 10 minutes were compared with those using an image capture frequency of 20 minutes. This was further controlled by removing one image out of two before running the script. This did not significantly modify the results, demonstrating that the script is robustly identifying divisions.

## Discussion

In this study, we showed that our automated software Kinetembryo based on image analysis and gray level variation offered a reliable tool for rapid annotation of human embryo morphokinetic parameters. Although some differences in the annotation were found when embryos were looked at individually, this tool could help set up high-throughput studies in large multicentric databases in a reproducible way. Altogether, these results suggest that Kinetembryo could move the field closer to better TLM standards, ultimately improving ART outcomes.

The TLM of embryo development applied to ART raises the hopes of better clinical outcomes for infertile couples, thanks to optimal embryo culture conditions and objective criteria for embryo selection in a single embryo transfer strategy. However, its clinical effectiveness over conventional morphology is still under discussion. In a recent meta-analysis, Chen *et al.* (2017) showed that clinical TLM may have the potential to improve outcomes but that more evidence was needed, while Pribenszky *et al.* (2017) concluded in another meta-analysis that there was an improvement of pregnancy rates and lower pregnancy losses when using TLM. The pros and cons were recently debated in a review on TLM (Paulson *et al.*, 2018). Overall, experts in both groups provided sound but opposing arguments and finally reached the conclusion that robust and appropriately designed clinical trials are needed to draw a firm conclusion on the clinical usefulness of TLM in ART. Such multicentric randomized trials (i.e. Randomized Controlled Trials) in large cohorts imply the analysis of huge databases originating from various settings. This means time-consuming manual annotation of embryo morphokinetic parameters in each participating center and large data management capacity. Moreover, the analysis of such results requires robust inter-centric embryo annotation, limiting as much as possible inter-operator variability (Sundvall *et al.*, 2013; Martínez-Granados *et al.*, 2017). Automated annotation of early embryo development probably represents the best way to reach such high standards. In this study, we have shown that our automated image analysis process was able to proceed to a full embryo annotation from first cleavage up to expanded blastocyst stage. Moreover, we observed improvable but quite good correlation with manual assessment validated on a large study population. Up to now, most of the published morphokinetic embryo selection algorithms were mainly based on early morphokinetic events (Rubio *et al.*, 2014; Petersen *et al.*, 2016). Following this strategy, Eeva<sup>®</sup>, a semi-automated annotation tool for early embryo events detection, was developed with



**Figure 5 Performance test of the automated annotation tool.** Performance is reflected by the graphical representation (boxplot in black and the median in red) and the density (violin plot: in beige) of the difference between manual annotation and automatic at each embryonic stage. On each box, the central mark indicates the median, and the bottom and top edges of the box indicate the 25th and 75th percentiles, respectively. The whiskers extend to the most extreme data points not considered as outliers. The intra-class correlation coefficient (ICC) calculation was also performed for 600 videos with more typical embryo development, excluding videos showing chaotic development, videos starting at the cleavage stage and videos with a high degree of fragmentation.

the aim of improving the selection of embryos with high developmental potential for early stages embryo transfer in addition to Day 3 morphology (Conaghan et al., 2013). The use of Eeva® in addition to standard morphology assessment has been compared with standard morphology assessment in a few RCTs with different conclusions. While Eeva® seemed to give objective information for helping embryologists with various levels of experience to choose the best embryo to transfer in a double-blinded multi-center study with 54 patients undergoing blastocyst transfer (Diamond et al., 2015), an observational prospective two-center study did not demonstrate any improvement in cycle outcome when using Eeva® (Kieslinger et al., 2016).

While providing promising preliminary results, the automated process described here should be further refined in order to improve its accuracy. The software did not have access to the 3D images but only one focal plane, while the manual annotations were realized on 3D images. We are confident in the fact that getting access to the export of 3D videos would enhance the quality of the correlation with the same algorithm and its extension to a 3D ROI. This 3D aspect is a current limitation of the data but not of the software that is expected to perform better on 3D data. One of the technical limitations of our work lies within the duration of the video. The more embryo stages the video contains, the more information the script has to identify them correctly. For example, automated tB annotation does not stand alone, as it is partly based on morula and early blastulation parameters.

The next step would be to undergo external validation in a multicentric design, regardless of the commercial TLM device used in the participating IVF centers. Once validated, this kind of automated process could help address the issues raised in most clinical studies on TLM, i.e. lack of robustness, objectivity and statistical power due to monocentric analysis (Armstrong et al., 2018). Indeed, predictive models have shown poorer performance when tested externally (Fréour et al., 2015; Barrie et al., 2017). Moreover, Storr et al. (2018) recently described discrepancies between published selection models and morphological assessment by trained embryologists.

Deep learning analysis and artificial intelligence are now tested or used in most medical fields. However, these approaches were tested in the field of embryology only recently (Curchoe and Bormann, 2019). Reported preliminary results are extremely encouraging and could be used to predict blastocyst quality (Khosravi et al., 2019). In another very exciting multicentric study, deep learning analysis was shown to predict fetal heart pregnancy from thousands of time-lapse images, with high performance (Tran et al., 2019). However, it should be kept in mind that artificial intelligence can suffer from biases that are not easily detectable (Osoba and Wesler, 2017) and that the implementation of new technologies for clinical decision making should always be done carefully, after proper validation and critical evaluation. In that sense, it would be beneficial to combine algorithmic image analysis with deep learning.

## Conclusion

We developed an automated morphokinetic annotation process, which can easily be transferred to multiple platforms. Although this tool needs to be improved and externally validated, it could pave the way to a refined, deeper understanding of human preimplantation development and support further discovery of predictive tests to assist embryologists in embryo selection, ultimately improving ART success rates.

## Supplementary data

Supplementary data are available at *Human Reproduction* online.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Pr Pierre-Antoine Gouraud and Abel Garnier (Clinique des données, CHU de Nantes) for their help with the statistics and the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell).

## Authors' roles

MF: drafted the manuscript, development of the automated annotation tool, analysis of the results. AR: drafted the manuscript, manual time-lapse annotation, analysis of the results. MM: development of the automated annotation tool. JL: manual time-lapse annotation. DM: expert knowledge in bioinformatics, critical revision of the manuscript. PB: critical revision of the manuscript. PPG: study design, supervision of the study, expert knowledge in image analysis. LD: study design, supervision of the study, critical revision of the manuscript. TF: study design, supervision of the study, critical revision of the manuscript, validated the final version of the manuscript.

## Funding

Finox-Gedeon Richter Forward grant 2016 and NeXT (ANR-16-IDEX-0007).

## Conflict of interest

We have no conflicts of interest to declare.

## References

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011; **26**:1270–1283.

Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; **5**:CD011320.

Barrie A, Homburg R, McDowell G, Brown J, Kingsland C, Troup S. Examining the efficacy of six published time-lapse imaging embryo selection algorithms to predict implantation to demonstrate the need

for the development of specific, in-house morphokinetic selection algorithms. *Fertil Steril* 2017; **107**:613–621.

Basile N, Barrière P, Meseguer M, Fréour T. Time-lapse in the IVF lab: how should we assess potential benefit? *Hum Reprod* 2015; **30**:1276.

Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, Nagy ZP, Ubaldi FM. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum Reprod* 2014; **29**:1173–1181.

Castelló D, Motato Y, Basile N, Remohí J, Espejo-Catena M, Meseguer M. How much have we learned from time-lapse in clinical IVF? *Mol Hum Reprod* 2016; **22**:719–727.

Chen AA, Tan L, Suraj V, Reijo Pera R, Shen S. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. *Fertil Steril* 2013; **99**:1035–1043.

Chen M, Wei S, Hu J, Yuan J, Liu F. Does time-lapse imaging have favorable results for embryo incubation and selection compared with conventional methods in clinical *in vitro* fertilization? A meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. *PLoS One* 2017; **12**: e0178720.

Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, Aguilar J, Chamayou S, Esbert M, Sayed S, Time-Lapse User Group. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum Reprod* 2014; **29**:2650–2660.

Conaghan J, Chen AA, Willman SP, Ivani K, Chenette PE, Boostanfar R, Baker VL, Adamson GD, Abusief ME, Gvakharia M *et al*. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertil Steril* 2013; **100**:412–419.e5.

Curchoe CL, Bormann CL. Artificial intelligence and machine learning for human reproduction and embryology presented at ASRM and ESHRE 2018. *J Assist Reprod Genet* 2019; **36**:591–600.

Diamond MP, Suraj V, Behnke EJ, Yang X, Angle MJ, Lambe-Steinmiller JC, Watterson R, Athayde Wirka K, Chen AA, Shen S. Using the Eeva Test™ adjunctively to traditional day 3 morphology is informative for consistent embryo assessment within a panel of embryologists with diverse experience. *J Assist Reprod Genet* 2015; **32**:61–68.

Dolinko AV, Farland LV, Kaser DJ, Missmer SA, Racowsky C. National survey on use of time-lapse imaging systems in IVF laboratories. *J Assist Reprod Genet* 2017; **34**:1167–1172.

European IVF-monitoring Consortium, European Society of Human Reproduction and Embryology, Calhaz-Jorge C, De Geyter C, Kupka MS, de Mouzon J, Erb K, Mocanu E, Motrenko T, Scaravelli G *et al*. Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2017; **32**:1957–1973.

Fleiss J. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 1981.

Fréour T, Le Fleuter N, Lammers J, Splingart C, Reignier A, Barrière P. External validation of a time-lapse prediction model. *Fertil Steril* 2015; **103**:917–922.

Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum Reprod Update* 2015; **21**:727–747.

Hoffman R. The modulation contrast microscope: principles and performance. *J Microsc* 1977; **110**:205–222.

- Khosravi P, Kazemi E, Zhan Q, Malmsten JE, Toschi M, Zisimopoulos P, Sigaras A, Lavery S, Cooper LAD, Hickman C et al. Deep learning enables robust assessment and selection of human blastocysts after *in vitro* fertilization. *NPJ Digit Med* 2019;**2**:21.
- Kieslinger DC, De Gheselle S, Lambalk CB, De Sutter P, Kosteljik EH, Twisk JWR, van Rijswijk J, Van den Abbeel E, Vergouw CG. Embryo selection using time-lapse analysis (Early Embryo Viability Assessment) in conjunction with standard morphology: a prospective two-center pilot study. *Hum Reprod* 2016;**31**:2450–2457.
- Koo TK, Li MY. A guideline of selecting and reporting intraclass correlation coefficients for reliability research. *J Chiropr Med* 2016;**15**:155–163.
- Kushnir VA, Barad DH, Albertini DF, Darmon SK, Gleicher N. Systematic review of worldwide trends in assisted reproductive technology 2004–2013. *Reprod Biol Endocrinol* 2017;**15**:6.
- Martínez-Granados L, Serrano M, González-Utor A, Ortíz N, Badajoz V, Olaya E, Prados N, Boada M, Castilla JA, Special Interest Group in Quality of ASEBIR (Spanish Society for the Study of Reproductive Biology). Inter-laboratory agreement on embryo classification and clinical decision: conventional morphological assessment vs. time lapse. *PLoS One* 2017;**12**: e0183328.
- Mölder A, Drury S, Costen N, Hartshorne GM, Czanner S. Semiautomated analysis of embryoscope images: using localized variance of image intensity to detect embryo developmental stages. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 2015;**87**:119–128.
- Osoba OA, Welser W IV. *An Intelligence in Our Image: the Risks of Bias and Errors in Artificial Intelligence*. Santa Monica, California, USA: Rand Corporation, 2017.
- Paternot G, Devroe J, Debrock S, D'Hooghe TM, Spiessens C. Intra- and inter-observer analysis in the morphological assessment of early-stage embryos. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;**7**:105.
- Paulson RJ, Reichman DE, Zaninovic N, Goodman LR, Racowsky C. Time-lapse imaging: clearly useful to both laboratory personnel and patient outcomes versus just because we can doesn't mean we should. *Fertil Steril* 2018;**109**:584–591.
- Petersen BM, Boel M, Montag M, Gardner DK. Development of a generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on Day 3. *Hum Reprod* 2016;**31**:2231–2244.
- Pribenszky C, Nilselid AM, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2017;**35**:511–520.
- Rhenman A, Berglund L, Brodin T, Olovsson M, Milton K, Hadziostmanovic N, Holte J. Which set of embryo variables is most predictive for live birth? A prospective study in 6252 single embryo transfers to construct an embryo score for the ranking and selection of embryos. *Hum Reprod* 2015;**30**:28–36.
- Rubio I, Galán A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J, Meseguer M. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil Steril* 2014;**102**:1287–1294.e5.
- Sanchez T, Seidler EA, Gardner DK, Needleman D, Sakkas D. Will noninvasive methods surpass invasive for assessing gametes and embryos? *Fertil Steril* 2017;**108**:730–737.
- Storr A, Venetis C, Cooke S, Kilani S, Ledger W. Time-lapse algorithms and morphological selection of day-5 embryos for transfer: a preclinical validation study. *Fertil Steril* 2018;**109**:276–283.e3.
- Sundvall L, Ingerslev HJ, Breth Knudsen U, Kirkegaard K. Inter- and intra-observer variability of time-lapse annotations. *Hum Reprod* 2013;**28**:3215–3221.
- Tran D, Cooke S, Illingworth PJ, Gardner DK. Deep learning as a predictive tool for fetal heart pregnancy following time-lapse incubation and blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2019;**34**:1011–1018.

## D] Synthèse des principaux résultats obtenus

- L'analyse externalisée de plusieurs modèles morphocinétiques prédictifs de la grossesse, et principalement le KIDScore™Day 5, sur notre base de données a confirmé une corrélation entre le score embryonnaire et les chances de grossesse mais a également montré les limites de ce type de modèles avec un faible pouvoir prédictif de la grossesse.

- L'absence de recours possible au DPI-A en France nous a conduit une revue de la littérature sur l'existence d'une corrélation entre la morphocinétique embryonnaire et la ploïdie embryonnaire. Il ne semble exister aucun paramètre morphocinétique ou modèle utilisant la morphocinétique embryonnaire capable de prédire suffisamment précisément le statut chromosomique de l'embryon. La technologie time-lapse ne peut donc pas être utilisée seule dans ce but et ne peut pas substituer la biopsie embryonnaire et l'analyse génomique associée dans le DPI-A. Il est de même pour le statut chromosomique des embryons biopsiés dans le cadre du DPI chromosomique. En effet nous n'avons mis en évidence aucun paramètre morphocinétique corrélé au statut chromosomique équilibré ou non pour les embryons biopsiés dans notre centre chez des couples porteurs de réarrangements chromosomiques et ayant recours au DPI.

- Les résultats précédents pouvant être expliqués par une hétérogénéité dans l'annotation manuelle de la morphocinétique embryonnaire couplée à l'absence d'étude multicentrique de grande échelle, nous avons développé un outil d'annotation morphocinétique totalement automatisé par analyse d'images. Cet outil est capable d'annoter rapidement et de façon reproductible des larges bases de données morphocinétiques. Son application permettrait grâce à l'analyse de vidéos provenant de centres différents de mettre en évidence des paramètres morphocinétiques universellement utilisables et prédictifs de la grossesse.

## Discussion

L'utilisation de la morphocinétique embryonnaire dans le choix de l'embryon à transférer est une pratique de plus en plus répandue mais qui a montré ses limites : l'absence d'algorithme décisionnel universellement utilisables par les laboratoires d'AMP, l'existence d'une variabilité inter et intra-opérateurs dans l'annotation embryonnaire et des difficultés à l'annotation manuelle du développement embryonnaire. Le DPI-A s'est largement imposé comme technique additionnelle de sélection embryonnaire et offre des résultats particulièrement intéressants dans les populations féminines plus âgées du fait de la forte prévalence de l'aneuploïdie embryonnaire au-delà de 35 ans chez la femme. Son caractère invasif suggère la nécessité de mettre en évidence de nouveaux marqueurs non-invasifs du statut chromosomique embryonnaire, dont la morphocinétique embryonnaire.

La revue de la littérature effectuée autour de la question d'une éventuelle corrélation entre la morphocinétique embryonnaire et le statut chromosomique embryonnaire n'a pas démontré l'existence d'un tel lien. De plus, une analyse monocentrique des paramètres de la morphocinétique embryonnaire d'embryons biopsiés dans le cas du DPI pour indication chromosomique n'a également pas permis de mettre en évidence l'existence de paramètres morphocinétiques embryonnaires prédictif du statut chromosomique embryonnaire. Le recours à la biopsie embryonnaire dans le but de déterminer le statut chromosomique de l'embryon semble donc à ce jour être la seule technique suffisamment sensible et spécifique. Pour autant, la morphocinétique embryonnaire permettrait dans le cas où plusieurs embryons euploïdes étaient obtenus, de mieux discriminer l'embryon avec le meilleur potentiel implantatoire. Une première étude sur 244 couples (86) avait ainsi montré de meilleures chances de grossesse après transfert d'un embryon euploïde sélectionné à l'aide d'un système Time-Lapse que sélectionner uniquement grâce à la morphologie embryonnaire. Une étude plus récente menée sur 830 embryons euploïdes a permis d'identifier la durée jusqu'au stade morula ( $tM < 80h$ ) et la morphologie du trophoctoderme comme étant les plus prédictifs de naissance vivante après biopsie et transfert unique d'un blastocyste congelé (87). Enfin une dernière publication reporte une association importante entre le score du KIDScore Day5™ et les chances de grossesse évolutive dans une population d'embryons euploïdes et transférés de manière unique (88).

Alors que la dernière revue de la littérature Cochrane (89) sur l'utilisation de la morphocinétique embryonnaire en comparaison de la morphologie classique dans le choix de l'embryon à transférer ne met pas en évidence une supériorité de la technologie time-lapse en termes de taux de grossesse clinique ou de naissance vivante, il apparaît indispensable que de nouveaux essais cliniques randomisés, multicentriques et impliquant une très grande cohorte soient réalisés. Devant la nécessité de pouvoir annoter un nombre conséquent de vidéos de développement embryonnaire, tout en s'émancipant de la problématique de variabilité inter-opérateurs, le développement d'outils d'annotation automatisés de la morphocinétique embryonnaire était une priorité. Nous avons ainsi développé un outil performant capable d'annoter de façon très reproductible une grande quantité de données. Cet outil a pour finalité une utilisation en recherche, et est destiné à l'annotation de la cinétique de développement embryonnaire à partir de vidéos exportées de bases de données multicentriques, cela permettrait ainsi de s'affranchir de la variabilité existant dans l'annotation manuelle et de pouvoir comparer les données issues de ces centres multiples. La capacité du logiciel à annoter de façon précise des vidéos issues du système Embryoscope™ a été démontrée dans notre étude. Bien qu'au niveau individuel, il existe des différences entre l'annotation manuelle réalisée par l'embryologiste du laboratoire et l'annotation automatisée, la différence entre les deux méthodes d'annotation était acceptable dans la majorité des cas. Ces différences parfois importantes dans le résultat de l'annotation doivent prendre en compte les difficultés de l'annotation manuelle telles qu'elles sont décrites dans la publication de Martinez-Granados et al (84) qui s'est attachée à étudier les résultats du programme espagnol de contrôle de qualité externe de la morphocinétique embryonnaire. Ainsi une grande variabilité inter-opérateurs existait pour les stades précoces du développement embryonnaire (extrusion du deuxième globule polaire, apparition et disparition des pronucléi) et pour les paramètres suivants le stade 8 cellules. A contrario, notre logiciel est relativement performant sur ces stades avec un ICC supérieur à 0.7 pour la disparition des pronucléi, la première division et les stades tardifs du blastocyste.

Une des perspectives intéressantes d'une étude multicentrique serait la possibilité d'y inclure des données issues de différents systèmes d'incubation time-lapse, sous-entendant des conditions de culture possiblement différentes mais surtout une



qualité d'image variable en termes de luminosité, de pixel, de taille du puit et de localisation des informations de temps. Le recueil de vidéos issues d'autres systèmes time lapse a déjà débuté avec le premier envoi de cinquante vidéos d'embryons mis en culture dans un système Miri-TL (Esco). Des images de développement embryonnaire issues du système Geri viendront également compléter la base de données. Le logiciel n'a pas encore été testé sur de telles données humaines mais l'annotation de la cinétique de développement de trois vidéos de développement embryonnaire murin enregistrées à l'aide d'un microscope confocal a été une réussite, laissant espérer la possibilité de succès sur des vidéos humaines.

Une des critiques du logiciel d'annotation automatisée est l'absence de caractérisation morphologique possible mais seulement la détection des événements classiques du développement embryonnaire. En effet, bien que l'évaluation morphologique de la qualité embryonnaire soit décriée pour son relativement faible pouvoir prédictif de l'implantation embryonnaire, certains paramètres sont toujours indispensables dans le choix de l'embryon à transférer.

Ainsi, la détection du nombre de pronuclei le lendemain de la mise en fécondation des ovocytes n'a pas été possible de façon suffisamment précise avec la technologie utilisée. En effet c'est une étape primordiale de l'évaluation de la qualité embryonnaire, les ovocytes anormalement fécondés pouvant se développer jusqu'au stade blastocyste dont le transfert n'est pas recommandé (90). Nous nous sommes attachés à rechercher ces pronuclei par leur forme arrondie et donc la détection de cercles au sein de la zone d'intérêt mais nous avons été limités par leur superposition possible et surtout l'analyse possible dans le seul plan focal extrait de l'Embryoscope™ qui ne permettait pas toujours leur visualisation de façon nette.

De même, la classification de Gardner (41) évaluant la morphologie du blastocyste selon son expansion, la qualité du bouton embryonnaire et du trophoctoderme reste à ce jour toujours un élément important dans le choix de l'embryon à transférer, possiblement en addition de la cinétique de développement embryonnaire. Les blastocystes présentant des caractéristiques morphologiques positives pourraient même être corrélés avec une incidence diminuée de l'aneuploïdie embryonnaire (91,92), bien que d'autres auteurs ne montrent pas d'impact de la morphologie sur les taux d'aneuploïdie (93). Cependant, la technologie d'analyse d'image utilisée par

notre logiciel permet seulement de mesurer l'expansion de la zone pellucide mais pas de grader qualitativement le bouton embryonnaire ni le trophoctoderme.

D'autres éléments du développement embryonnaire apportent des compléments au choix de l'embryon à transférer, tels que la présence de blastomères multinucléés ou d'anomalies mitotiques (clivages directs, fusions cellulaires) (94) et ne peuvent pas être détectés par analyse conventionnelle d'images.

Devant l'évidente limitation de notre logiciel basé sur l'analyse conventionnelle d'image dans la détection de ces derniers paramètres morphologiques, une autre technologie doit y être intégrée en complément (95). L'intelligence artificielle (IA) a déjà trouvé sa place dans de nombreux domaines de la médecine et commence à investir l'AMP (96). Cette technologie utilise une approche très différente, nécessitant une étape d'apprentissage à travers des réseaux de neurones.

Comme preuve de concept, nous allons premièrement développer un modèle deep learning ayant les mêmes objectifs que l'outil basé sur l'analyse d'image : annotation automatisée de la morphocinétique embryonnaire et détection et compte des pronuclei. Un Réseau neuronal convolutif (CNN) sera premièrement envisagé pour l'analyse d'images isolées provenant de notre système time-lapse puis un Réseau de neurones récurrents pour l'analyse séquentielle. La performance de ces systèmes de neurones sera ultérieurement testée sur des bases de données multicentriques.

Plusieurs équipes ont déjà développé des outils basés sur l'intelligence artificielle et capables de grader morphologiquement des images du développement embryonnaire avec une bonne concordance avec les observations des embryologistes. Ainsi le logiciel appelé STORK (97) se base sur l'analyse de 50 000 vidéos de morphocinétique embryonnaire et est capable de correctement grader la qualité des blastocystes en comparaison avec trois embryologistes experts avec une aire sous la courbe (AUC) de 0,93. Une autre équipe propose une approche identique avec un logiciel basé sur un réseau de neurones convolutionnel permettant de grader automatiquement le bouton embryonnaire et le trophoctoderme de manière équivalentes aux embryologistes dans 71.9% et 76.4% des cas pour le bouton embryonnaire et le trophoctoderme respectivement (98). Cependant, l'AUC du modèle pour la prédiction de l'implantation n'était pas significativement différente des embryologistes (AUC de 0,66 et 0,64,), ce modèle est donc limité pour la

prédiction de la grossesse. D'autres équipes n'ont pas cherché à utiliser l'IA pour automatiser la classification morphologique embryonnaire mais ont cherché à corrélérer directement les images analysées par leur logiciel à l'issue du cycle de stimulation. Ainsi un premier modèle développé à partir de 1052 cycles de FIV ou ICSI permet dans une étude monocentrique de prédire la grossesse clinique avec une AUC à 0,74.(99). L'approche utilisée par Tran et al. (100) pour le développement de leur modèle d'IA, appelé IVY, utilise l'apprentissage approfondi pour analyser des images de développement embryonnaire acquises par time-lapse et prédire la survenue de la grossesse clinique. Cette étude a utilisé 10683 images de développement embryonnaire provenant de 1648 patients. L'issue de grossesse était connue pour 8836 embryons dont seulement 694 (8%) résultaient en une grossesse clinique. Les auteurs décrivent un très fort pouvoir prédictif de grossesse clinique pour ce modèle utilisé en routine dans le réseau de cliniques IVF Australia avec une AUC à 0,93. Cependant, aucun essai clinique randomisé n'a permis à ce jour de valider ce modèle. Un dernier modèle appelé Life Whisperer (101) a récemment été publié et s'est intéressé à étudier de façon rétrospective 8886 images de blastocystes au 5<sup>ème</sup> jour de développement, capturées par microscopie classique et provenant de 11 centres d'AMP. Les résultats décrivent une augmentation de prédiction de la grossesse clinique de 24,7% par rapport à l'évaluation morphologique procédée par les embryologistes. Cependant le pouvoir prédictif de ce modèle semble également limité avec une AUC de 0,71 pour la grossesse clinique. Étrangement, l'AUC correspondant à la décision des embryologistes n'était seulement que de 0,38, ce qui paraît faible au regard des pouvoirs prédictifs de la morphologie classique du blastocyste décrits dans la littérature (102,103). Il apparaît cependant que l'IA soit un virage inévitable à prendre dans l'assistance au choix de l'embryon à transférer.

Tout comme pour les modèles basés sur la morphocinétique embryonnaire, ces modèles reposant sur l'intelligence artificielle souffrent de limitations reposant sur leur caractère monocentrique ou incluant peu de centres d'AMP. Une solution proposée réside dans l'utilisation de plateformes de stockage et de transmission d'informations médicales dans des conditions protectrices de la confidentialité des données et des patients. Ainsi le projet Healthchain, auquel nous participons, permet l'extraction des vidéos issues des systèmes time-lapse, leur stockage sur une

plateforme sécurisée et anonymisée appelée Substra (104) et leur analyse par des stratégies d'apprentissage fédéré. C'est une technique d'apprentissage automatique qui forme un algorithme sur plusieurs serveurs décentralisés contenant des échantillons de données locaux, sans échange de leurs échantillons de données. L'apprentissage fédéré permet à plusieurs acteurs de créer un modèle d'apprentissage automatique commun et robuste sans partage de données, abordant ainsi des problèmes critiques tels que la confidentialité des données, la sécurité des données, les droits d'accès aux données et l'accès aux données hétérogènes. L'aboutissement d'un tel projet permettrait le développement d'un outil entraîné à partir de larges données multicentriques et donc possiblement beaucoup plus prédictif que les modèles actuellement déployés.

Devant l'incapacité actuelle des différentes stratégies de sélection embryonnaire à être suffisamment sensibles et spécifiques dans l'identification de l'embryon avec le meilleur potentiel implantatoire, il paraît judicieux d'identifier de nouveaux types de marqueurs de qualité embryonnaire et de les combiner avec l'existant pour augmenter leur pouvoir prédictif. Depuis de nombreuses années, l'étude du métabolisme embryonnaire a été identifiée comme une approche séduisante d'évaluation de la qualité embryonnaire (105). Le but de cette stratégie est de pouvoir identifier un biomarqueur dans le milieu de culture embryonnaire, qu'il soit positivement ou négativement prédictif de l'implantation embryonnaire. Plusieurs approches sont définies en fonction du type de marqueur recherché, ainsi la protéomique s'intéresse à l'étude du sécrétome embryonnaire dans le milieu de culture, soit par analyse d'un spectre protéique global ou le dosage d'une protéine en particulier ; la métabolomique est définie quant à elle par l'étude des métabolites issus du fonctionnement cellulaire.

L'amélioration des techniques de protéomiques dans les années 2000, notamment grâce au développement de la spectrométrie de masse, a amené plusieurs équipes à suivre cette voix prometteuse. Ainsi, Katz-Jaffe et al. (106,107) décrivent la présence d'ubiquitine dans le milieu de culture des blastocystes avec un meilleur potentiel implantatoire. Une autre technologie utilisant des puces a comparé le profil protéique de milieux de culture de blastocystes implantés et de blastocyste ne s'étant pas implantés et a montré une différence entre les deux types de profils (108). Bien que ces résultats soient encourageants, ces techniques ne sont toujours pas utilisées en

routine (109). En effet, la limitation majeure à la démocratisation de la protéomique réside dans les difficultés techniques liées aux milieux de culture. Les embryons sont cultivés dans de très faibles volumes (quelques dizaines de microlitres) de milieux de culture dont la composition est complexe (110), peu reproductible entre les lots (111) et surplombée par la présence d'une grande majorité d'albumine qui est un frein à l'identification de protéines présentes en faible concentration.

Concernant la métabolomique, les études se sont principalement attachées à explorer le métabolisme énergétique embryonnaire, soit via l'utilisation de dioxygène par l'embryon (112) ou la consommation de glucose (113). Cependant, ces mêmes auteurs, concluent à l'absence d'utilisation de ces technologies en routine de par les difficultés techniques liées au faibles volumes de milieu de culture et l'absence de reproductibilité des résultats (114).

Seules deux études ont évalué la combinaison de marqueurs morphocinétiques avec des dosages dans le milieu de culture embryonnaire. Une première publication a ainsi combiné le dosage d'interleukine 6 (IL-6) dans le milieu de culture de blastocystes avec une évaluation morphologique du blastocyste et la durée du second cycle cellulaire (cc2) pour élaborer un algorithme décisionnel de l'embryons à transférer (115). Cette étude pilote réalisée à partir des données de 28 embryons issus de don d'ovocyte, montrait des résultats prometteurs qui n'ont malheureusement pas été confirmés dans de plus larges essais. Une deuxième étude s'est quant à elle attachée à mesurer le statut oxydatif embryonnaire avec la technologie de Thermochemiluminescence dans le milieu de culture embryonnaire et a établi un arbre décisionnel à partir des données morphologiques et cinétiques de 505 embryons (116). Bien que ces résultats semblent intéressants, seuls 76.5% des embryons avec le meilleur score avaient donné lieu à une grossesse. Le caractère prédictif de ce modèle ne paraît donc pas suffisamment spécifique.

Devant l'intérêt évident de la mise en évidence de biomarqueurs dans le milieu de culture embryonnaire, nous avons développé une autre approche que celles basées sur l'identification d'un marqueur par analyse différentielle de profils protéomiques entre les milieux de culture issus des blastocystes ayant donné une grossesse et ceux n'ayant pas abouti à la grossesse. Ces approches, certes séduisantes théoriquement, sont limitées par les technologies actuelles, le faible volume de milieu de culture disponible pour l'analyse et la présence d'albumine en forte concentration.

Ainsi, à partir de l'analyse transcriptomique de cellules uniques d'embryons humains donnés à la recherche, notre groupe a élaboré un pseudo-temps transcriptomique de l'embryon pré-implantatoire humain et a ainsi pu définir une signature transcriptomique des différents stades de développement embryonnaire et surtout des signatures transcriptomiques de chacune des trois lignées cellulaires définissant le blastocyste : le trophoctoderme, l'épiblaste et l'endoderme primitif (16). Ces données ont ensuite été validées par immunofluorescence. IFI16 a alors pu être mis en évidence comme marqueur spécifique de l'épiblaste et NR2F2 comme marqueur spécifique de la maturation trophoblastique.

A l'aide de ces données transcriptomiques, il est possible d'élaborer un sécrétome virtuel embryonnaire en fonction du stade de développement. En collaboration avec l'équipe de Charles Pineau, les données de transcriptomique ont été combinées avec 4 bases de données protéomiques (Human Protein Atlas, Vertebrate Secretome Database, CloneCollection and Signal Peptide database) afin de prédire les protéines potentiellement sécrétées par le blastocyste. Nous nous intéresserons particulièrement aux protéines pouvant être sécrétées par les cellules du trophoctoderme, et donc possiblement présentes dans le milieu de culture embryonnaire. Les 4 bases de données ont pu prédire 512 protéines comme possiblement sécrétées dans le milieu de culture embryonnaire. Cette liste a été ensuite enrichie de fonctions biologiques à l'aide des termes Gene Ontology (GO). Les protéines candidates ont ainsi été triées de par les fonctions physiologiques les plus intéressantes pour le mécanisme de l'implantation embryonnaire. Les milieux de culture embryonnaire sont composés en grande partie d'albumine et d'autres protéines inconnues (110), rendant l'identification de peptides sécrétés en faible quantité difficile par spectrométrie de masse sur de très faibles volumes (20-30  $\mu$ L). Ainsi, la spectrométrie de masse en tandem avec Parallel Reaction monitoring (PRM) (117) sera utilisée pour identifier les protéines candidates précédemment sélectionnées. Cette technologie permet l'identification et la quantification de peptides présents en très faible quantité dans des fluides biologiques complexes. Un panel de protéines validées devra ensuite être testé et recherché par dosage immunochimique dans des milieux de culture.

## Conclusion

Les outils à disposition des embryologistes pour le choix de l'embryon à transférer sont multiples. Cependant, aucun d'entre eux n'est à ce jour suffisamment discriminatoire pour permettre d'assurer la grossesse. La morphocinétique embryonnaire est un paramètre certainement clé dans l'évaluation de la qualité embryonnaire et l'automatisation de l'annotation morphocinétique, couplée à l'intelligence artificielle et des dosages dans les milieux de culture embryonnaire paraissent être une réponse innovante et prometteuse pour la mise au point d'algorithmes décisionnels sensibles et spécifiques du potentiel implantatoire embryonnaire. L'ensemble de ces approches sont en cours de développement et devront être validées sur de très grandes cohortes pour prouver leur efficacité.

## References

1. Papon S, Beaumel C. Bilan démographique 2019. La fécondité se stabilise en France. 2020;
2. Agence de la Biomedecine. Rapport médical et scientifique de l'assistance médicale à la procréation 2018.
3. ART in Europe, 2015: results generated from European registries by ESHRE. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 1 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32123753>
4. de Mouzon J, Chambers GM, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Banker M, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology 2012†. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1 août 2020;35(8):1900-13.
5. Thurin A, Hausken J, Hillensjö T, Jablonowska B, Pinborg A, Strandell A, et al. Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. *N Engl J Med*. 2 déc 2004;351(23):2392-402.
6. Pandian Z, Marjoribanks J, Ozturk O, Serour G, Bhattacharya S. Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev*. 29 juill 2013;(7):CD003416.
7. Drakopoulos P, Blockeel C, Stoop D, Camus M, de Vos M, Tournaye H, et al. Conventional ovarian stimulation and single embryo transfer for IVF/ICSI. How many oocytes do we need to maximize cumulative live birth rates after utilization of all fresh and frozen embryos? *Hum Reprod Oxf Engl*. févr 2016;31(2):370-6.
8. Vaughan DA, Leung A, Resetkova N, Ruthazer R, Penzias AS, Sakkas D, et al. How many oocytes are optimal to achieve multiple live births with one stimulation cycle? The one-and-done approach. *Fertil Steril*. 2017;107(2):397-404.e3.
9. Blockeel C, Campbell A, Coticchio G, Esler J, Garcia-Velasco JA, Santulli P, et al. Should we still perform fresh embryo transfers in ART? *Hum Reprod Oxf Engl*. 01 2019;34(12):2319-29.
10. Wong KM, Wely M van, Mol F, Repping S, Mastenbroek S. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2017 [cité 17 sept 2020];(3). Disponible sur: <https://www-cochranelibrary-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD011184.pub2/full>
11. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address: [ASRM@asrm.org](mailto:ASRM@asrm.org), Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. Guidance on the limits to the number of embryos to transfer: a committee opinion. *Fertil Steril*. avr 2017;107(4):901-3.
12. Debrock S, Spiessens C, Meuleman C, Segal L, De Loecker P, Meeuwis L, et al. New Belgian legislation regarding the limitation of transferable embryos in in vitro fertilization cycles does not significantly influence the pregnancy rate but reduces the multiple pregnancy rate in a threefold way in the Leuven University Fertility Center. *Fertil Steril*. mai 2005;83(5):1572-4.
13. Verberg MFG, Eijkemans MJC, Heijnen EMEW, Broekmans FJ, de Klerk C, Fauser BCJM, et al. Why do couples drop-out from IVF treatment? A prospective cohort study. *Hum Reprod Oxf Engl*. sept 2008;23(9):2050-5.



14. Kim J, Gye MC, Kim MK. Role of occludin, a tight junction protein, in blastocoel formation, and in the paracellular permeability and differentiation of trophectoderm in preimplantation mouse embryos. *Mol Cells*. 30 avr 2004;17(2):248-54.
15. Coticchio G, Lagalla C, Sturmey R, Pennetta F, Borini A. The enigmatic morula: mechanisms of development, cell fate determination, self-correction and implications for ART. *Hum Reprod Update*. 01 2019;25(4):422-38.
16. Meistermann D, Loubersac S, Reignier A, Firmin J, Champion VF, Kilens S, et al. Spatio-temporal analysis of human preimplantation development reveals dynamics of epiblast and trophectoderm. *bioRxiv*. 10 avr 2019;604751.
17. Deglincerti A, Croft GF, Pietila LN, Zernicka-Goetz M, Siggia ED, Brivanlou AH. Self-organization of the in vitro attached human embryo. *Nature*. 12 2016;533(7602):251-4.
18. Zhou F, Wang R, Yuan P, Ren Y, Mao Y, Li R, et al. Reconstituting the transcriptome and DNA methylome landscapes of human implantation. *Nature*. 2019;572(7771):660-4.
19. Turco MY, Gardner L, Kay RG, Hamilton RS, Prater M, Hollinshead MS, et al. Trophoblast organoids as a model for maternal-fetal interactions during human placentation. *Nature*. 2018;564(7735):263-7.
20. Ubaldi F, Anniballo R, Romano S, Baroni E, Albricci L, Colamaria S, et al. Cumulative ongoing pregnancy rate achieved with oocyte vitrification and cleavage stage transfer without embryo selection in a standard infertility program. *Hum Reprod Oxf Engl*. mai 2010;25(5):1199-205.
21. Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod Oxf Engl*. mars 1997;12(3):532-41.
22. Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod Oxf Engl*. nov 2000;15(11):2394-403.
23. ALPHA Scientists In Reproductive Medicine, ESHRE Special Interest Group Embryology. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online*. juin 2011;22(6):632-46.
24. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod Oxf Engl*. juin 2011;26(6):1270-83.
25. Berger DS, Zapantis A, Merhi Z, Younger J, Polotsky AJ, Jindal SK. Embryo quality but not pronuclear score is associated with clinical pregnancy following IVF. *J Assist Reprod Genet*. mars 2014;31(3):279-83.
26. De Neubourg D, Gerris J, Mangelschots K, Van Royen E, Vercruyssen M, Elseviers M. Single top quality embryo transfer as a model for prediction of early pregnancy outcome. *Hum Reprod Oxf Engl*. juin 2004;19(6):1476-9.
27. Van Montfoort APA, Dumoulin JCM, Kester ADM, Evers JLH. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod Oxf Engl*. sept 2004;19(9):2103-8.

28. Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril.* déc 2001;76(6):1150-6.
29. Holte J, Berglund L, Milton K, Garello C, Gennarelli G, Revelli A, et al. Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. *Hum Reprod Oxf Engl.* févr 2007;22(2):548-57.
30. Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, et al. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod Oxf Engl.* juill 2007;22(7):1973-81.
31. Rhenman A, Berglund L, Brodin T, Olovsson M, Milton K, Hadziosmanovic N, et al. Which set of embryo variables is most predictive for live birth? A prospective study in 6252 single embryo transfers to construct an embryo score for the ranking and selection of embryos. *Hum Reprod Oxf Engl.* janv 2015;30(1):28-36.
32. Guerif F, Lemseffer M, Leger J, Bidault R, Cadoret V, Chavez C, et al. Does early morphology provide additional selection power to blastocyst selection for transfer? *Reprod Biomed Online.* oct 2010;21(4):510-9.
33. Stensen MH, Tanbo T, Storeng R, Byholm T, Fèdorcsak P. Routine morphological scoring systems in assisted reproduction treatment fail to reflect age-related impairment of oocyte and embryo quality. *Reprod Biomed Online.* juill 2010;21(1):118-25.
34. Fesahat F, Montazeri F, Sheikhha MH, Saeedi H, Dehghani Firouzabadi R, Kalantar SM. Frequency of chromosomal aneuploidy in high quality embryos from young couples using preimplantation genetic screening. *Int J Reprod Biomed.* mai 2017;15(5):297-304.
35. Eaton JL, Hacker MR, Harris D, Thornton KL, Penzias AS. Assessment of day-3 morphology and euploidy for individual chromosomes in embryos that develop to the blastocyst stage. *Fertil Steril.* juin 2009;91(6):2432-6.
36. Tao J, Tamis R, Fink K, Williams B, Nelson-White T, Craig R. The neglected morula/compact stage embryo transfer. *Hum Reprod Oxf Engl.* juin 2002;17(6):1513-8.
37. Lagalla C, Coticchio G, Sciajno R, Tarozzi N, Zacà C, Borini A. Alternative patterns of partial embryo compaction: prevalence, morphokinetic history and possible implications. *Reprod Biomed Online.* mars 2020;40(3):347-54.
38. Ebner T, Moser M, Shebl O, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Tews G. Morphological analysis at compacting stage is a valuable prognostic tool for ICSI patients. *Reprod Biomed Online.* janv 2009;18(1):61-6.
39. Ivec M, Kovacic B, Vlaisavljevic V. Prediction of human blastocyst development from morulas with delayed and/or incomplete compaction. *Fertil Steril.* déc 2011;96(6):1473-1478.e2.
40. Kang SM, Lee SW, Jeong HJ, Yoon SH, Koh MW, Lim JH, et al. Clinical outcomes of elective single morula embryo transfer versus elective single blastocyst embryo transfer in IVF-ET. *J Assist Reprod Genet.* mai 2012;29(5):423-8.

41. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol.* juin 1999;11(3):307-11.
42. Ahlström A, Westin C, Reismer E, Wikland M, Hardarson T. Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Hum Reprod Oxf Engl.* déc 2011;26(12):3289-96.
43. Thompson SM, Onwubalili N, Brown K, Jindal SK, McGovern PG. Blastocyst expansion score and trophectoderm morphology strongly predict successful clinical pregnancy and live birth following elective single embryo blastocyst transfer (eSET): a national study. *J Assist Reprod Genet.* déc 2013;30(12):1577-81.
44. Ebner T, Tritscher K, Mayer RB, Oppelt P, Duba H-C, Maurer M, et al. Quantitative and qualitative trophectoderm grading allows for prediction of live birth and gender. *J Assist Reprod Genet.* janv 2016;33(1):49-57.
45. Kovacic B, Vlasisavljevic V, Reljic M, Cizek-Sajko M. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reprod Biomed Online.* juin 2004;8(6):687-94.
46. Heitmann RJ, Hill MJ, Richter KS, DeCherney AH, Widra EA. The simplified SART embryo scoring system is highly correlated to implantation and live birth in single blastocyst transfers. *J Assist Reprod Genet.* avr 2013;30(4):563-7.
47. Paternot G, Devroe J, Debrock S, D'Hooghe TM, Spiessens C. Intra- and inter-observer analysis in the morphological assessment of early-stage embryos. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 2009;7:105.
48. Paternot G, Wetzels AM, Thonon F, Vansteenbrugge A, Willemen D, Devroe J, et al. Intra- and interobserver analysis in the morphological assessment of early stage embryos during an IVF procedure: a multicentre study. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 15 sept 2011;9:127.
49. Storr A, Venetis CA, Cooke S, Kilani S, Ledger W. Inter-observer and intra-observer agreement between embryologists during selection of a single Day 5 embryo for transfer: a multicenter study. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2017;32(2):307-14.
50. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* avr 2001;2(4):280-91.
51. Webster A, Schuh M. Mechanisms of Aneuploidy in Human Eggs. *Trends Cell Biol.* 2017;27(1):55-68.
52. Martin RH. Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online.* avr 2008;16(4):523-31.
53. van Kooij RJ, Looman CW, Habbema JD, Dorland M, te Velde ER. Age-dependent decrease in embryo implantation rate after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* nov 1996;66(5):769-75.
54. La Marca A, Minasi MG, Sighinolfi G, Greco P, Argento C, Grisendi V, et al. Female age, serum antimüllerian hormone level, and number of oocytes affect the rate and number of euploid blastocysts in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 2017;108(5):777-783.e2.

55. National Summary Report [Internet]. [cité 15 avr 2020]. Disponible sur: [https://www.sartcorsonline.com/rptCSR\\_PublicMultYear.aspx?reportingYear=2016](https://www.sartcorsonline.com/rptCSR_PublicMultYear.aspx?reportingYear=2016)
56. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med*. 5 juill 2007;357(1):9-17.
57. Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update*. août 2011;17(4):454-66.
58. Sermon K, Capalbo A, Cohen J, Coonen E, De Rycke M, De Vos A, et al. The why, the how and the when of PGS 2.0: current practices and expert opinions of fertility specialists, molecular biologists, and embryologists. *Mol Hum Reprod*. août 2016;22(8):845-57.
59. Treff NR, Scott RT. Four-hour quantitative real-time polymerase chain reaction-based comprehensive chromosome screening and accumulating evidence of accuracy, safety, predictive value, and clinical efficacy. *Fertil Steril*. 15 mars 2013;99(4):1049-53.
60. Brezina PR, Anchan R, Kearns WG. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? *J Assist Reprod Genet*. juill 2016;33(7):823-32.
61. Murphy LA, Seidler EA, Vaughan DA, Resetskova N, Penzias AS, Toth TL, et al. To test or not to test? A framework for counselling patients on preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A). *Hum Reprod Oxf Engl*. 1 févr 2019;34(2):268-75.
62. Coco R. Genetic counseling prior to Assisted Reproductive Technology procedures in the era of cytogenomics. *JBRA Assist Reprod*. 1 nov 2018;22(4):375-80.
63. Sachdev NM, McCulloh DH, Kramer Y, Keefe D, Grifo JA. The reproducibility of trophectoderm biopsies in euploid, aneuploid, and mosaic embryos using independently verified next-generation sequencing (NGS): a pilot study. *J Assist Reprod Genet*. mars 2020;37(3):559-71.
64. Victor AR, Griffin DK, Brake AJ, Tyndall JC, Murphy AE, Lepkowsky LT, et al. Assessment of aneuploidy concordance between clinical trophectoderm biopsy and blastocyst. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1 janv 2019;34(1):181-92.
65. Munné S, Kaplan B, Frattarelli JL, Child T, Nakhuda G, Shamma FN, et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good-prognosis patients: a multicenter randomized clinical trial. *Fertil Steril*. déc 2019;112(6):1071-1079.e7.
66. Popovic M, Dhaenens L, Boel A, Menten B, Heindryckx B. Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate diagnostic dilemma. *Hum Reprod Update*. 15 avr 2020;26(3):313-34.
67. Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. *N Engl J Med*. 19 nov 2015;373(21):2089-90.
68. Lee E, Costello MF, Botha WC, Illingworth P, Chambers GM. A cost-effectiveness analysis of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) for up to three complete assisted reproductive technology cycles in women of advanced maternal age. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2019;59(4):573-9.

69. Cimadomo D, Capalbo A, Ubaldi FM, Scarica C, Palagiano A, Canipari R, et al. The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. *BioMed Res Int.* 2016;2016:7193075.
70. Tiegs AW, Tao X, Zhan Y, Whitehead C, Kim J, Hanson B, et al. A multicenter, prospective, blinded, nonselection study evaluating the predictive value of an aneuploid diagnosis using a targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic testing for aneuploidy assay and impact of biopsy. *Fertil Steril.* 27 août 2020;
71. Mochizuki L, Gleicher N. The PGS/PGT-A controversy in IVF addressed as a formal conflict resolution analysis. *J Assist Reprod Genet.* mars 2020;37(3):677-87.
72. Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online.* sept 2008;17(3):385-91.
73. Storr A, Venetis C, Cooke S, Kilani S, Ledger W. Time-lapse algorithms and morphological selection of day-5 embryos for transfer: a preclinical validation study. *Fertil Steril.* févr 2018;109(2):276-283.e3.
74. Fréour T, Le Fleuter N, Lammers J, Spingart C, Reignier A, Barrière P. External validation of a time-lapse prediction model. *Fertil Steril.* avr 2015;103(4):917-22.
75. Barrie A, Homburg R, McDowell G, Brown J, Kingsland C, Troup S. Examining the efficacy of six published time-lapse imaging embryo selection algorithms to predict implantation to demonstrate the need for the development of specific, in-house morphokinetic selection algorithms. *Fertil Steril.* mars 2017;107(3):613-21.
76. Petersen BM, Boel M, Montag M, Gardner DK. Development of a generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on Day 3. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2016;31(10):2231-44.
77. Basile N, Vime P, Florensa M, Aparicio Ruiz B, García Velasco JA, Remohí J, et al. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod Oxf Engl.* févr 2015;30(2):276-83.
78. Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online.* oct 2012;25(4):371-81.
79. Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CFL. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online.* mai 2013;26(5):477-85.
80. Liu Y, Qi F, Matson P, Morbeck DE, Mol BW, Zhao S, et al. Between-laboratory reproducibility of time-lapse embryo selection using qualitative and quantitative parameters: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* juin 2020;37(6):1295-302.
81. Fishel S, Campbell A, Foad F, Davies L, Best L, Davis N, et al. Evolution of embryo selection for IVF from subjective morphology assessment to objective time-lapse algorithms improves chance of live birth. *Reprod Biomed Online.* 1 janv 2020;40(1):61-70.

82. Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, Aguilar J, Chamayou S, Esbert M, et al. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum Reprod Oxf Engl.* déc 2014;29(12):2650-60.
83. ESHRE Working group on Time-lapse technology, Apter S, Ebner T, Freour T, Guns Y, Kovacic B, et al. Good practice recommendations for the use of time-lapse technology†. *Hum Reprod Open.* 2020;2020(2):hoaa008.
84. Martínez-Granados L, Serrano M, González-Utor A, Ortiz N, Badajoz V, López-Regalado ML, et al. Reliability and agreement on embryo assessment: 5 years of an external quality control programme. *Reprod Biomed Online.* mars 2018;36(3):259-68.
85. Wang R, Chen Z-J, Vuong LN, Legro RS, Mol BW, Wilkinson J. Large randomized controlled trials in infertility. *Fertil Steril.* juin 2020;113(6):1093-9.
86. Rocafort E, Enciso M, Leza A, Sarasa J, Aizpurua J. Euploid embryos selected by an automated time-lapse system have superior SET outcomes than selected solely by conventional morphology assessment. *J Assist Reprod Genet.* sept 2018;35(9):1573-83.
87. Rienzi L, Cimadomo D, Delgado A, Minasi MG, Fabozzi G, Gallego RD, et al. Time of morulation and trophectoderm quality are predictors of a live birth after euploid blastocyst transfer: a multicenter study. *Fertil Steril.* 2019;112(6):1080-1093.e1.
88. Lee C-I, Chen C-H, Huang C-C, Cheng E-H, Chen H-H, Ho S-T, et al. Embryo morphokinetics is potentially associated with clinical outcomes of single-embryo transfers in preimplantation genetic testing for aneuploidy cycles. *Reprod Biomed Online.* oct 2019;39(4):569-79.
89. Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Marjoribanks J, Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev.* 29 2019;5:CD011320.
90. Papale L, Fiorentino A, Montag M, Tomasi G. The zygote. *Hum Reprod Oxf Engl.* août 2012;27 Suppl 1:i22-49.
91. Minasi MG, Colasante A, Riccio T, Ruberti A, Casciani V, Scarselli F, et al. Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2016;31(10):2245-54.
92. Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, et al. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum Reprod Oxf Engl.* juin 2014;29(6):1173-81.
93. Viñals Gonzalez X, Odia R, Naja R, Serhal P, Saab W, Seshadri S, et al. Euploid blastocysts implant irrespective of their morphology after NGS-(PGT-A) testing in advanced maternal age patients. *J Assist Reprod Genet.* août 2019;36(8):1623-9.
94. Liu Y, Qi F, Matson P, Morbeck DE, Mol BW, Zhao S, et al. Between-laboratory reproducibility of time-lapse embryo selection using qualitative and quantitative parameters: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2 mai 2020;
95. Simopoulou M, Sfakianoudis K, Maziotis E, Antoniou N, Rapani A, Anifandis G, et al. Are computational applications the « crystal ball » in the IVF laboratory? The evolution from mathematics to artificial intelligence. *J Assist Reprod Genet.* sept 2018;35(9):1545-57.

96. Siristatidis C, Pouliakis A, Chrelias C, Kassanos D. Artificial intelligence in IVF: a need. *Syst Biol Reprod Med.* août 2011;57(4):179-85.
97. Khosravi P, Kazemi E, Zhan Q, Malmsten JE, Toschi M, Zisimopoulos P, et al. Deep learning enables robust assessment and selection of human blastocysts after in vitro fertilization. *NPJ Digit Med.* 2019;2:21.
98. Kragh MF, Rimestad J, Berntsen J, Karstoft H. Automatic grading of human blastocysts from time-lapse imaging. *Comput Biol Med.* déc 2019;115:103494.
99. Blank C, Wildeboer RR, DeCruo I, Tilleman K, Weyers B, de Sutter P, et al. Prediction of implantation after blastocyst transfer in in vitro fertilization: a machine-learning perspective. *Fertil Steril.* 2019;111(2):318-26.
100. Tran D, Cooke S, Illingworth PJ, Gardner DK. Deep learning as a predictive tool for fetal heart pregnancy following time-lapse incubation and blastocyst transfer. *Hum Reprod Oxf Engl.* 4 juin 2019;34(6):1011-8.
101. VerMilyea M, Hall JMM, Diakiw SM, Johnston A, Nguyen T, Perugini D, et al. Development of an artificial intelligence-based assessment model for prediction of embryo viability using static images captured by optical light microscopy during IVF. *Hum Reprod Oxf Engl.* 28 avr 2020;35(4):770-84.
102. Fishel S, Campbell A, Foad F, Davies L, Best L, Davis N, et al. Evolution of embryo selection for IVF from subjective morphology assessment to objective time-lapse algorithms improves chance of live birth. *Reprod Biomed Online.* 17 oct 2019;
103. Rehman KS, Bukulmez O, Langley M, Carr BR, Nackley AC, Doody KM, et al. Late stages of embryo progression are a much better predictor of clinical pregnancy than early cleavage in intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization cycles with blastocyst-stage transfer. *Fertil Steril.* mai 2007;87(5):1041-52.
104. Galtier MN, Marini C. Substra: a framework for privacy-preserving, traceable and collaborative Machine Learning [Internet]. 2019 [cité 5 oct 2020]. Disponible sur: <https://arxiv.org/abs/1910.11567>
105. Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum Reprod Update.* 6 janv 2015;
106. Katz-Jaffe MG, Linck DW, Schoolcraft WB, Gardner DK. A proteomic analysis of mammalian preimplantation embryonic development. *Reprod Camb Engl.* déc 2005;130(6):899-905.
107. Katz-Jaffe MG, Gardner DK, Schoolcraft WB. Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *Fertil Steril.* janv 2006;85(1):101-7.
108. Domínguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C. Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocysts. *Hum Reprod Oxf Engl.* sept 2008;23(9):1993-2000.
109. Katz-Jaffe MG, McReynolds S. Embryology in the era of proteomics. *Fertil Steril.* mars 2013;99(4):1073-7.

110. Dyrlund TF, Kirkegaard K, Poulsen ET, Sanggaard KW, Hindkjær JJ, Kjems J, et al. Unconditioned commercial embryo culture media contain a large variety of non-declared proteins: a comprehensive proteomics analysis. *Hum Reprod Oxf Engl.* nov 2014;29(11):2421-30.
111. Morbeck DE, Krisher RL, Herrick JR, Baumann NA, Matern D, Moyer T. Composition of commercial media used for human embryo culture. *Fertil Steril.* sept 2014;102(3):759-766.e9.
112. Vergouw CG, Kieslinger DC, Kostelijk EH, Botros LL, Schats R, Hompes PG, et al. Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial. *Hum Reprod Oxf Engl.* août 2012;27(8):2304-11.
113. Gardner DK, Wale PL, Collins R, Lane M. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Hum Reprod Oxf Engl.* août 2011;26(8):1981-6.
114. Vergouw CG, Heymans MW, Hardarson T, Sfontouris IA, Economou KA, Ahlström A, et al. No evidence that embryo selection by near-infrared spectroscopy in addition to morphology is able to improve live birth rates: results from an individual patient data meta-analysis. *Hum Reprod Oxf Engl.* mars 2014;29(3):455-61.
115. Dominguez F, Meseguer M, Aparicio-Ruiz B, Piqueras P, Quiñonero A, Simón C. New strategy for diagnosing embryo implantation potential by combining proteomics and time-lapse technologies. *Fertil Steril.* oct 2015;104(4):908-14.
116. Alegre L, Del Gallego R, Arrones S, Hernández P, Muñoz M, Meseguer M. Novel noninvasive embryo selection algorithm combining time-lapse morphokinetics and oxidative status of the spent embryo culture medium. *Fertil Steril.* 2019;111(5):918-927.e3.
117. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature.* 15 2016;537(7620):347-55.



**Titre :** Analyses du développement embryonnaire humain pré-implantatoire : comprendre pour mieux choisir

**Mots clés :** Time-lapse, FIV, AMP, Embryon

**Résumé :** Depuis les débuts de l'Assistance Médicale à la Procréation, le choix de l'embryon à transférer est une problématique majeure. En plus de l'évaluation morphologique embryonnaire, la technologie time-lapse avec l'analyse de la morphocinétique offre des résultats prometteurs mais pas une amélioration franche de la sélection embryonnaire étant donné l'hétérogénéité des cohortes étudiées et le caractère manuel de l'annotation embryonnaire.

L'analyse externalisée de plusieurs modèles morphocinétiques prédictifs de la grossesse, et principalement le KIDScore™Day 5, sur notre base de données a confirmé une corrélation entre le score embryonnaire et les chances de grossesse mais aussi leur faible pouvoir prédictif de la grossesse.

Une revue de la littérature conclut à l'absence de paramètre morphocinétique capable de prédire suffisamment précisément le statut chromosomique de l'embryon. La technologie time-lapse ne peut donc pas être utilisée seule dans ce but et ne peut pas substituer la biopsie embryonnaire et l'analyse génomique associée dans le DPI-A ou la recherche de translocation.

Les résultats précédents pouvant être expliqués par une hétérogénéité dans l'annotation manuelle de la morphocinétique embryonnaire couplée à l'absence d'étude multicentrique de grande échelle, nous avons développé un outil d'annotation morphocinétique totalement automatisé par analyse d'images. Cet outil est capable d'annoter rapidement et de façon reproductible des larges bases de données morphocinétiques.

**Title :** Preimplantation human embryo: understanding for better decision-making

**Keywords :** Time lapse, embryo, IVF, ART

**Abstract:** Since the beginning of Assisted Reproduction, the choice of the embryo to be transferred has been a major issue. In addition to the morphological evaluation, time-lapse technology with morphokinetic analysis offers promising results but not a clear improvement in embryo selection, given the heterogeneity of the cohorts studied and the manual nature of embryo annotation.

The externalized analysis of several morphokinetic models predictive of pregnancy, mainly KIDScore™Day 5, on our database has confirmed a correlation between embryo score and chances of pregnancy but also their low predictive power of pregnancy.

A review of the literature concluded that no morphokinetic parameter is capable of predicting the chromosomal status of the embryo with sufficient accuracy. Therefore, time-lapse technology alone cannot be used for this purpose and cannot substitute embryo biopsy and associated genomic analysis in PGD-A or translocation research.

Since the previous results can be explained by heterogeneous manual annotation of morphokinetic events in addition to the lack of large-scale studies, we have developed a fully automated morphokinetic annotation tool by image analysis. This tool is able to quickly and reproducibly annotate large morphokinetic databases.