

## Impact de la technique de vitrification (semi-automatique vs. manuelle) sur les ovocytes maturés lors d'une MIV rescue ?

Chaput L<sup>1,2</sup>, Dollet S<sup>2</sup>, Pierre E<sup>3</sup>, Pereira B<sup>4</sup>, Rodrigues C<sup>1</sup>, Grémeau AS<sup>1</sup>, Tchirkov A<sup>3</sup>, Marteil G<sup>2</sup> and Brugnon F<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>CHU Clermont-Ferrand, Laboratoire AMP-CECOS, F-63003 Clermont-Ferrand, France.

<sup>2</sup>UMR 1240 INSERM, IMoST, Université Clermont Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

<sup>3</sup>CHU Clermont-Ferrand, Service de Cytogénétique Médicale, F-63003 Clermont-Ferrand, France.

<sup>4</sup>CHU Clermont-Ferrand, DRCl-Délégation Recherche Clinique et Innovation, Méthodologie, Biostatistique, Data Management, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

Lors d'une ponction ovarienne pour ICSI ou préservation de fertilité après stimulation ovarienne, des ovocytes immatures peuvent être prélevés et leur utilisation future en Assistance Médicale à la Procréation (AMP) requiert une étape de maturation *in vitro* (MIV rescue). Néanmoins, il n'est pas clairement établi si l'étape de MIV rescue doit être réalisée avant ou après la vitrification. La vitrification est réalisée manuellement en routine dans les laboratoires d'AMP. Néanmoins il est apparu récemment sur le marché un automate de vitrification (Gavi©, Genea) dont l'efficacité n'a pas été évaluée pour la vitrification des ovocytes immatures. Notre étude vise à déterminer s'il est préférable ou non de maturer les ovocytes immatures avant leur vitrification et d'évaluer s'il existe un impact de la vitrification semi-automatique comparé au standard de la vitrification manuelle sur la qualité des ovocytes immatures et/ou maturés *in vitro*.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons comparé cinq groupes : ovocytes frais maturés *in vitro* (groupe contrôle), ovocytes frais maturés *in vitro* puis vitrifiés par l'automate Gavi® (groupe MIV+VITg) ou par une technique manuelle (Rapid Vit Omni©, Vitrolife) (MIV+VITm), et ovocytes vitrifiés à l'aide de l'automate ou manuellement puis maturés *in vitro* (VITg+MIV et VITm +MIV). La MIV rescue a été réalisée dans du milieu IVM© (Cooper Surgical) supplémenté avec 10% de HSA (Vitrolife) et 0.75 UI de FSH/LH (Menopur©, Ferring) et suivie en *time lapse* (Geri©, Genea) pendant 24 à 48 heures. Nous avons étudié la qualité de la maturation nucléaire en évaluant le taux et la cinétique de MIV rescue (temps de disparition de la vésicule germinative (GVBD) et d'expulsion du premier globule polaire (PBE)), la ségrégation des chromosomes homologues en méiose I par CGH-Array et la morphologie du fuseau méiotique ainsi que l'alignement des chromosomes par immunofluorescence en microscopie confocale.

250 ovocytes immatures bloqués en prophase de première division de méiose ont été inclus pour cette étude de janvier 2020 jusqu'à mars 2024 au sein du centre d'AMP du CHU de Clermont-Fd. Ces ovocytes proviennent de patientes âgées de moins de 37 ans, prises en charge en ICSI sans étiologie ovulatoire. Les caractéristiques clinico-biologiques des patientes (âge, IMC et dose totale de FSH reçue) sont comparables entre les 5 groupes ( $p > 0.05$ ). Nous n'avons pas observé de différence des taux de survie des ovocytes maturés *in vitro* puis vitrifiés par la méthode semi-automatique ou manuelle (90% vs. 92%). Néanmoins, le taux de survie des ovocytes immatures qui ont été vitrifiés à l'aide de l'automate était nettement inférieur comparé au taux de survie après vitrification standard manuelle (49% vs. 86%,  $p < 0.0001$ ). Le taux de maturation après MIV rescue n'était pas différent si la MIV était réalisée sur des ovocytes frais (groupe contrôle, MIV+VITg et MIV+VITm : 79%) comparé à des ovocytes réchauffés (VITg+MIV (79.5%) et VITm+MIV (67.5%)  $p = 0.199$ ). La cinétique de MIV, à partir de l'heure de la ponction ovocytaire, n'était pas différente au sein des groupes des ovocytes maturés en frais (groupe contrôle, MIV+VITg et MIV+VITm) et ceux maturés après la vitrification (VITg+MIV et VITm+MIV) quelle que soit la technique de vitrification ( $p = 0.427$ ). Aucun impact du stade ovocytaire ou de la technique de vitrification n'a été montré sur le taux d'aneuploïdie ( $p = 0.75$ ) (groupe contrôle

(38%) vs. MIV+VITg (25%) vs. MIV+VITm (30%) vs. VITg+MIV (30%) et VITm+MIV (35%) en CGH array ainsi que sur la morphologie du fuseau méiotique (analyse des fuseaux bipolaires) ( $p=0.982$ ) et sur l'alignement des chromosomes ( $p=0.788$ ). Une durée de GVBD plus courte, observée en time-lapse, de 6.06h [3.3 – 13.1] vs. 10.7h [6.5 – 27.8] a été montrée lorsque les ovocytes maturés *in vitro* avaient un fuseau bipolaire ( $p=0,008$ ) par rapport aux ovocytes avec un fuseau anormal.

Notre étude est, à notre connaissance, la première à comparer les effets de la méthode de vitrification semi-automatique et manuelle sur des ovocytes après MIV rescue en réalisant une analyse multiparamétrique (survie ovocytaire, taux et cinétique de MIV, aneuploïdie et qualité du fuseau méiotique ovocytaire). Nos résultats montrent que la vitrification des ovocytes est préférable après maturation *in vitro* et que la vitrification semi-automatique ne semble pas impacter ni le taux et la cinétique de MIV, ni la qualité de la maturation nucléaire en cas de MIV rescue.