



La fécondation *in vitro* : aujourd'hui et demain

► Les techniques de fécondation *in vitro* ont connu en quelques années d'importants développements. Une solution thérapeutique peut être proposée dans presque toutes les stérilités, y compris dans les stérilités masculines les plus sévères du fait de la mise au point de l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI). Les traitements actuels de stimulation sont lourds et entraînent des complications (grossesses multiples et syndrome d'hyperstimulation ovarienne) ainsi que des effets secondaires. Le devenir des grossesses et des enfants est altéré par une grande fréquence de grossesses multiples mais le pourcentage de malformations et les indices de développement sont comparables à ceux des enfants issus de grossesses spontanées de rang équivalent. Les progrès attendus dans les années à venir concernent le développement de la congélation d'ovocyte ou de tissu ovarien, la maturation ovocytaire (ou folliculaire) *in vitro* et la simplification des protocoles actuels de stimulation ◀

TIRÉS À PART

F. Olivennes.

Le premier enfant conçu grâce à la fécondation *in vitro* (FIV), Louise Brown, a plus de 20 ans [1]. Sa sœur, également conçue par FIV, a récemment donné naissance à un enfant. En 20 ans, les progrès des techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) ont été vertigineux. Ces progrès font chaque jour reculer les limites de la prise en charge thérapeutique en multipliant les pathologies qui peuvent relever de telle ou telle technique. Ces prouesses technologiques soulèvent parfois des problèmes moraux ou éthiques du fait de l'irruption de la « procréatique » dans certains des fondements même de nos sociétés, bouleversant les repères ayant trait à la filiation, aux liens familiaux et parfois aux sources mêmes de l'individu. Aujourd'hui un enfant peut avoir cinq « parents » ! Les deux parents génétiques, ceux qui élèvent l'enfant et qui, l'un et/ou l'autre, peuvent être différents des deux premiers en cas de dons de gamètes, et la mère porteuse en cas de « prêt » d'utérus (modalité interdite en France).

Très médiatisée du fait des enjeux évoqués, l'AMP n'en demeure pas moins une discipline médicale à part

**François Olivennes
Rénato Fanchin
Claudia Righini
Nathalie Ledee
René Frydman**

F. Olivennes, R. Fanchin, C. Righini, N. Ledee, R. Frydman : Service de gynécologie-obstétrique, Hôpital Antoine-Béclère, 157, rue de la porte-de-Trivaux, 92140 Clamart, France.

entière qui vient en aide aux couples infertiles et permet de faire progresser les connaissances en matière de procréation. Nous nous proposons ici de présenter l'arsenal thérapeutique disponible aujourd'hui, de décrire les complications de ces méthodes et de tenter de faire le point sur les progrès attendus pour le début de ce nouveau millénaire.

L'assistance médicale à la procréation aujourd'hui

La fécondation *in vitro*

La fécondation *in vitro* associe aujourd'hui 4 étapes essentielles : la stimulation ovarienne, la ponction folliculaire (ou recueil ovocytaire), la FIV proprement dite et le transfert embryonnaire.

La stimulation ovarienne a rapidement supplanté le cycle spontané utilisé au début de la mise au point de la méthode. Cette stimulation ovarienne permet d'induire un développement multifolliculaire (10 follicules en moyenne) par l'administration de gonadotrophines recombinantes. La stimulation ovarienne constitue, pour la patiente, l'étape la plus lourde du

traitement. Elle est précédée d'une phase de blocage, obtenue par l'administration d'agonistes du GnRH induisant une hypophysectomie médicale réversible. La stimulation impose des injections quotidiennes pendant une quinzaine de jours associées à une surveillance (monitorage) par des échographies et des prélèvements sanguins répétés.

La maturité des follicules est attestée par échographie. Une fois celle-ci atteinte, une ponction folliculaire échoguidée est pratiquée et le liquide folliculaire est transmis au laboratoire. Le sperme du conjoint est obtenu le même jour par masturbation.

La fécondation *in vitro* proprement dite consiste à inséminer les ovocytes avec les spermatozoïdes. Après 48 heures d'incubation à 37 °C, les embryons sont comptabilisés, analysés et évalués en grades selon des paramètres essentiellement morphologiques (nombre de blastomères, régularité, fragmentation) indiquant leur qualité. Ainsi, seuls les embryons considérés comme normaux seront choisis pour le transfert ou, si nécessaire, pour une congélation.

Le transfert a lieu au deuxième ou troisième jour postponction. Un cathéter contenant les embryons est introduit dans l'utérus par le canal cervical et les embryons sont déposés dans la cavité utérine. Le choix du nombre d'embryons à transférer dépend de plusieurs facteurs au premier rang desquels figurent l'âge de la patiente, le nombre de tentatives, la qualité embryonnaire et, bien évidemment, le souhait de la patiente. On transfère habituellement 2 à 3 embryons. Ce nombre peut être augmenté chez les patientes de plus de 38 ans chez lesquelles, en général, quatre embryons sont transférés. Le transfert de 2 embryons seulement est vivement recommandé chez les femmes jeunes et en début de prise en charge. Certains auteurs ont observé que le transfert de 2 embryons sélectionnés pour leur bon grade permet de réduire le pourcentage de grossesses multiples sans diminuer le taux de grossesse [2].

Les embryons qui ne sont pas transférés (dits surnuméraires) peuvent être congelés si leur qualité le permet. Cette pratique a débuté en 1983. La conservation de ces embryons donne

à la patiente de nouvelles chances de grossesse avec des traitements beaucoup plus simples pour préparer l'endomètre au transfert des embryons. Toutefois, la fragilité des embryons face aux étapes de congélation/décongélation diminue d'environ 2 fois les chances de développement embryonnaire ultérieur. De plus, le destin de ces embryons congelés non transférés pose un difficile problème éthique. En effet, en l'absence de projet parental, les embryons peuvent être donnés ou détruits, cette décision relevant de l'accord du couple, impossible à obtenir si celui-ci a été perdu de vue. Depuis juillet 1994, cette possibilité de destruction n'est pas explicitement proposée. Ce point délicat, qui aurait dû être discuté dans le cadre de la révision de la loi de bioéthique en juillet 1999, reste encore à ce jour en suspens, la révision étant rapportée.

La fécondation assistée

L'absence de fécondation, observée dans certaines stérilités masculines, est à l'origine du développement des techniques de fécondation assistée. Celles-ci ont tout d'abord consisté à introduire quelques spermatozoïdes sous la zone pellucide, mais les résultats furent décevants.

C'est en 1992 qu'a été rapportée la première naissance obtenue par l'injection directe d'un spermatozoïde dans le cytoplasme ovocytaire [3]. Depuis lors, les succès de l'ICSI (*intra-cytoplasmic sperm injection*) ont révolutionné la prise en charge des stérilités masculines. En effet, il ne faut qu'un seul spermatozoïde par ovocyte, ce qui permet d'obtenir une grossesse en cas d'oligospermie sévère. Ainsi, des grossesses ont été obtenues avec des spermatozoïdes prélevés dans l'épididyme en cas d'azoospermie (absence de spermatozoïde) excrétoire, ou directement dans le testicule, en cas d'azoospermie sécrétoire [4].

Plus récemment encore, des enfants sont nés après qu'une ICSI ait été pratiquée avec des spermatides, les précurseurs des spermatozoïdes [5] ou même avec des spermatocytes mûris *in vitro* [6]. Peu d'équipes dans le monde réalisent l'ICSI à partir des précurseurs des spermatozoïdes et les résultats, en terme de grossesses, res-

sent très décevants. De plus, cette pratique suscite maintes controverses dont les arguments méritent considération.

Du fait qu'elle « court-circuite » la fécondation, l'ICSI a soulevé beaucoup de craintes concernant les enfants ainsi conçus. Les risques évoqués peuvent relever de deux grandes catégories. Ceux qui sont liés à la méthode elle-même, avec par exemple le risque d'introduction de matériel étranger dans l'ovocyte (toxine, virus, ADN, particules, etc.) ou encore le traumatisme ovocytaire causé par la perforation, qui pourrait retentir sur l'embryon et le fœtus. Il n'existe jusqu'à présent dans la littérature aucune publication confirmant ou infirmant ces craintes chez l'homme. Une étude chez le singe a cependant récemment évoqué la possibilité de lésions du fuseau méiotique [7]. Le deuxième grand groupe de risques est celui lié à la population même des hommes infertiles traités. Ces hommes sont en effet plus fréquemment porteurs d'anomalies chromosomiques et géniques.

En ce qui concerne les anomalies chromosomiques, leur fréquence est inversement proportionnelle au niveau de production spermatique. Cette fréquence dans la population masculine générale est de 0,6 % à 1 %. Elle est d'environ 5 % pour les hommes oligospermes et de 10 % pour les azoospermes. Ces anomalies chromosomiques peuvent porter sur le nombre (syndrome de Klinefelter) ou sur la macrostructure des chromosomes (translocations, inversions, etc.). La transmission de ces anomalies chromosomiques pose des problèmes éthiques. Le syndrome de Klinefelter se caractérise par une atrophie testiculaire accompagnée d'une stérilité, d'éventuels troubles à la puberté (gynécomastie) et, dans certains cas, de légers troubles du comportement. Devant ce tableau clinique sans handicap majeur, le recours à une interruption de grossesse en cas de diagnostic prénatal de syndrome de Klinefelter est donc fort discutable et controversé [8]. Il est rejeté le plus souvent par les centres pluridisciplinaires légalement chargés de décider de l'issue des grossesses. Un entretien avec les parents avant ICSI leur apportant les informations nécessaires doit aboutir à une attitude consen-

suelle. D'une façon générale, bien que proposé par certains auteurs, le recours au diagnostic génétique pré-implantatoire (DPI), en cas d'anomalies gonosomiques chez des embryons conçus après ICSI, est actuellement exclus [9].

Les microdélétions affectant le chromosome Y peuvent entraîner un trouble de la spermatogenèse. Plusieurs gènes (ou régions) candidats ont été décrits (AZF, DAZ, RBM) dans le cadre des azoospermies ou des oligo-astheno-téatospermies (OAT) sévères (voir l'article de J.P. Siffroi *et al.*, p. 307 de ce numéro). La transmission de la stérilité à la descendance masculine constitue une interrogation qui n'aura pas de réponse avant une vingtaine d'années [10].

Les relations entre les délétions du chromosome Y et l'infertilité masculine ont été décrites dès 1976. Les grandes délétions observées appartenaient à une région nommée AZF (*azoospermic factor*). Ces délétions ne sont pas spécifiques des azoospermies, mais sont également retrouvées en cas d'OAT sévères. La fréquence des microdélétions chez les hommes infertiles varie, selon les publications, entre 3% et 19% [10]. Il est donc impératif d'informer les couples sur la possibilité de transmission de cette pathologie à leur descendance masculine. Le dépistage de ces microdélétions chez les hommes candidats à l'ICSI pour une atteinte spermatique « inexpliquée » est réalisé systématiquement dans de nombreuses équipes. Il est à noter que l'équipe belge, pionnière de l'ICSI, a récemment pratiqué un DPI à la recherche de la microdélétion de l'Y portée par le père pour ne replacer que des embryons « sains » (résultats non publiés). Cette sélection ne pourrait pas être réalisée en France car les indications de DPI, encadrées par la loi, impliquent l'existence d'une « maladie d'une exceptionnelle gravité et reconnue comme incurable au moment du diagnostic », définition qui ne correspond aucunement aux anomalies des gonosomes.

Quant au suivi des enfants conçus grâce à l'ICSI, leur nombre est encore insuffisant pour avoir une étude significative. Le suivi à long terme est inexistant puisque les premiers enfants conçus ont entre 8 et 9 ans. Dans une étude portant sur

877 enfants âgés de 1 mois à 2 ans, l'équipe belge, pionnière de l'ICSI, retrouvait, en 1996, 2,6% de malformations diverses [11]. Sur un total de 486 caryotypes (sur 904 grossesses), 1,2% d'anomalies des gonosomes ont été retrouvées (en plus de 1,2% d'anomalies héritées des parents). Cette augmentation des anomalies gonosomiques n'est pas retrouvée par toutes les équipes.

L'ESHRE (*European Society of Human Reproduction and Endocrinology*) a rapporté en 1996 et en 1998 l'activité des centres FIV pratiquant l'ICSI et ne retrouve d'augmentation d'incidence des malformations et des anomalies chromosomiques.

Concernant le développement psychomoteur, il persiste une controverse [12], certains auteurs ayant noté une fréquence augmentée des retards mentaux légers [13], alors que l'équipe belge présente des résultats rassurants sur les enfants âgés de 2 ans [14]. Les résultats rapportés dans des congrès récents semblent confirmer le développement psychomoteur normal des enfants nés par ICSI (résultats non publiés).

Les dons de gamètes

Le recours aux gamètes de donneurs se justifie lorsque, pour un des membres du couple: – les gamètes sont absents; – les gamètes sont à risque d'être porteurs d'une anomalie génétique grave; – les gamètes ne permettent pas d'obtenir une grossesse. Le don de sperme, utilisé depuis longtemps pour les atteintes masculines, ne sera pas développé ici [15].

Les résultats obtenus grâce aux dons d'ovocytes sont plus récents. La méthode consiste à féconder des ovocytes d'une femme (dite donneuse) ayant accepté ce don avec le sperme du mari de la patiente. Les embryons ainsi obtenus sont transférés dans l'utérus de la patiente (dite receveuse). La première grossesse dans l'espèce humaine a été réussie en 1983. Cette technique est utilisée chez les femmes ayant une agénésie ovarienne (comme dans le syndrome de Turner) ou des ovaires non fonctionnels (ménopause précoce inexpliquée, castration chirurgicale ou post-radio- ou chimiothérapie), chez des femmes porteuses d'anomalies géné-

tiques graves, chez certaines femmes ménopausées (hors de France) et, parfois, après de nombreux échecs de FIV. Les indications des dons effectués à l'hôpital Antoine-Béclère sont présentées dans le *Tableau 1*.

Deux types de don peuvent être pratiqués: les dons directs lors desquels la donneuse connaît la destination de ses ovocytes (dons entre sœurs par exemple) et les dons anonymes lors desquels la destination des ovocytes est inconnue de la donneuse et parfois aussi de la receveuse (double anonymat).

En France, la loi de bioéthique interdit le don direct qui se pratique dans certains pays d'Europe. Le choix de la donneuse s'effectue sur les principaux caractères du morphotype (couleur de la peau, des cheveux, des yeux, taille, etc.). Une enquête génétique est également réalisée pour éviter de cumuler les facteurs de risques de la donneuse et du mari de la receveuse. En France, les donneuses dites relationnelles (femme sensibilisée par les difficultés de procréation d'une amie ou d'une parente) sont les plus fréquentes. Toute rémunération est interdite, ainsi que toute publicité des centres d'AMP pour recruter des donneuses d'ovocytes. De plus, la loi interdit de subordonner la prise en charge d'une patiente au fait qu'elle trouve une donneuse, ce qui complique la réalisation pratique du don. Tout un ensemble de dispositions légales, fixées par la loi de bioéthique et ses décrets d'application, encadrent la procédure du don d'ovocytes en France. La donneuse doit avoir procréé, une enquête génétique doit être réalisée, ainsi que le dépistage d'un certain nombre de maladies transmissibles (SIDA, hépatite B et C, syphilis, infections à Epstein Barr virus ou à cytomégalovirus). L'accord du conjoint doit être obtenu. Les dispositions sont en fait très proches de celles des banques de sperme (CECOS).

Pour la receveuse, le bilan comporte également une enquête génétique, un caryotype et la détection des maladies transmissibles (VIH, hépatites B et C, etc.). Une procédure légale (devant le juge ou le notaire) doit être entreprise pour officialiser l'accueil de l'ovocyte. Une enquête psychologique est également menée chez la receveuse et la donneuse.

Deux méthodes peuvent être utili-

Tableau I

INDICATIONS DU DON D'OVOCYTES À L'HOPITAL ANTOINE-BÉCLÈRE ENTRE 1988 ET 1998

Ménopause précoce (MP)	n = 132	41,6 %
Échec FIV	n = 69	26,6 %
Aménorrhée primaire	n = 58	18,1 %
MP chirurgicale	n = 26	8,1 %
MP iatrogène	n = 23	7,2 %
Génétique	n = 11	3,4 %

sées. Dans le don synchronisé, la receveuse reçoit un ou plusieurs embryons frais et le cycle préparatoire au remplacement doit être synchronisé sur le programme de stimulation de la donneuse. Dans le don différé, les embryons obtenus sont congelés, et le transfert à la receveuse a lieu dans un cycle ultérieur. C'est cette dernière méthode qui est utilisée en France depuis le décret de décembre 1996, qui impose la congélation systématique des embryons permettant de reconstruire, 6 mois plus tard, le statut sérologique de la donneuse, prévenant ainsi tout risque de contamination.

Le traitement de la donneuse est en fait un traitement classique de FIV avec une stimulation ovarienne qui doit éviter toutes complications et en particulier le syndrome d'hyperstimulation ovarienne.

Le traitement de la receveuse dépend de son statut ovarien. Chez les patientes ovarioprives, le traitement substitutif (combinaison œstro-progestative mimant le cycle menstruel normal) pourra être adapté pour synchroniser le transfert. La durée de la phase de supplémentation œstrogénique peut être prolongée et le début de l'administration de la progestérone adapté au moment de la ponction chez la donneuse. L'obligation de passer par la congélation simplifie considérablement la procédure car il est facile de choisir le moment du transfert en fonction du traitement substitutif destiné à préparer l'endomètre à recevoir l'embryon. Cette congélation a cependant réduit considérablement les taux de grossesse qui se situent entre 15 % et 25 %.

Le pourcentage de grossesses après transfert d'embryons frais faisant suite à un don d'ovocyte peut

dépasser 50 % et dépend surtout de l'âge de la donneuse [16].

Indications et résultats de la FIV

La fécondation *in vitro* était initialement conçue pour les patientes ayant une obturation tubaire bilatérale. Puis, les indications se sont étendues à toutes les étiologies d'infertilité. On distingue cependant les indications absolues, stérilités qui relèvent exclusivement de la FIV : il s'agit essentiellement des atteintes tubaires définitives (trompes obturées ou absentes) et les stérilités masculines sévères (atteinte majeure du spermogramme). L'arrivée de l'ICSI a multiplié ces indications qui représentent désormais près de 40 % des tentatives de FIV réalisées en France (Tableau II). Les indications relatives comprennent en fait toutes les stérilités, la FIV prenant sa place dans la stratégie thérapeutique après l'échec des méthodes plus simples (stimulations simples, inséminations).

Les résultats de la FIV en France ont progressé pendant ces 10 premières années, mais ils sont aujourd'hui en légère stagnation (Tableau III). Les centres de FIV rapportent leurs résultats auprès d'une fédération (FIVNAT) qui les analyse et permet ainsi une évaluation des pratiques. Depuis peu, obligation a été faite de rapporter aussi ces résultats auprès de la DRASS*.

Actuellement, la cause majeure d'échec tient au faible pourcentage d'implantation des embryons obtenus (de 10 % à 20 %). Ces échecs d'implantation peuvent être dus à la qualité des embryons qui dépend elle-même essentiellement de celle des ovocytes. Jusqu'à présent, les méthodes d'analyse étaient limitées et

se résumaient surtout à l'appréciation de la maturation nucléaire. La maturation cytoplasmique et membranaire ne sont pas évaluables. Le rôle du spermatozoïde dans le potentiel implantatoire de l'embryon est évoqué indirectement par l'accumulation des échecs chez certaines femmes jeunes, indemnes de pathologie, ayant recours à l'ICSI pour une atteinte du sperme de leur conjoint. Les échecs d'implantation peuvent être aussi liés à une pathologie endométriale : – pathologie macroscopique avec atteinte du tissu endométrial (exposition durant la vie fœtale au Distilbène®, synéchies postcuretage par exemple), – atteinte de la vascularisation utérine mise en évidence par le Doppler des vaisseaux ou, plus récemment, – mise en évidence de contractions utérines qui pourraient être responsables de l'expulsion des embryons transférés [17].

L'âge chronologique joue un rôle indiscutable dans le pourcentage de succès en AMP. Les taux de grossesse par ponction après 40 ans sont de l'ordre de 7 %, avec 50 % de fausses couches, soit moins de 5 % d'accouchement. Dans une étude récente de FIVNAT, les taux cumulés de grossesse pour 8 tentatives de FIV passent de 60 % à 17 % entre 35 et 41 ans [18]. Une modération s'impose donc dans les traitements que l'on peut raisonnablement proposer à une patiente de plus de 40 ans. De plus, l'évaluation de la réserve ovarienne, par le biais des dosages hormonaux de base, permet de récuser les patientes chez lesquelles les chances de « ramener un bébé à la maison » (*take home baby rate* des Anglo-Saxons) sont trop faibles. Les grossesses anecdotiques obtenues grâce aux traitements par des doses élevées de gonadotrophines, des combinaisons œstro-progestatives, ou par la multiplication des tentatives de FIV, ne doivent pas encourager les prises en charge excessives de patientes exposées inutilement aux risques (et aux coûts !) de ces traitements. Un effort est par ailleurs indispensable pour diffuser l'information sur la baisse de la fertilité chez la femme longtemps avant la ménopause.

*Direction régionale des actions sanitaires et sociales.

Tableau II
ÉVOLUTION DES INDICATIONS DE LA FIV DEPUIS 1993 (FIVNAT 1998)

	1993	1994	1995	1996	1997
Tubaire isolée	36,4%	35,1%	33,8%	34,5%	30,8%
Tubaire + masc.	17,1%	16,5%	16,6%	14,1%	18,5%
Tubaire + FIVD	2,0%	2,8%	0,8%	0,5%	0,5%
Tubaires totales	56,0%	54,9%	51,5%	50,9%	49,5%
Masculine isolée	17,5%	18,0%	19,0%	19,8%	23,7%
FIVD	4,9%	5,0%	2,6%	1,9%	2,3%
Endométriose isolée	2,8%	2,9%	4,6%	4,8%	6,5%
Causes multiples	3,0%	2,9%	4,7%	6,7%	0,4%
Idiopathique	15,3%	15,8%	17,3%	17,7%	17,4%

Masc. : atteinte du spermogramme. FIVD : Fécondation in vitro avec sperme de donneur.

Tableau III
TAUX DE GROSSESSES CLINIQUES EN FONCTION DE L'ANNÉE ET DE L'INDICATION (%) (FIVNAT 1998).

	Taux par année, par ponction					Taux global	
	1993	1994	1995	1996	1997	/ponction/transfert	
Tubaire isolée	21,5	22,0	20,7	22,3	23,4	21,5	25,0
Tub + masc	18,6	17,9	17,8	18,2	18,8	18,0	23,1
Tubaire + FIVD	24,6	24,1	26,9	15,7	14,3	23,5	28,6
Tubaires totales	20,7	20,8	19,9	21,1	21,5	20,5	24,5
Masculine isolée	17,2	14,1	16,8	17,5	20,6	16,5	25,6
FIVD	24,3	25,0	20,0	24,3	18,6	23,5	29,2
Endométriose	23,6	20,1	19,5	24,7	23,8	21,4	27,4
Causes multiples	15,5	18,3	17,9	16,6	20,0	17,1	21,7
Idiopathique	20,4	19,7	18,3	21,6	21,1	19,8	25,8

Les chiffres indiquent les pourcentages de grossesses obtenues. Noter qu'il existe une discrète différence entre le pourcentage de grossesses obtenues rapportées au nombre de ponctions effectuées et le pourcentage de grossesses obtenues après transfert.

Complications

Les traitements lourds qu'impose la FIV ne sont pas exempts de complications, au premier rang desquelles figurent les grossesses multiples. Leurs fréquences restent bien trop élevées : environ 20 % à 25 % de grossesses gémellaires et 3 % à 5 % de grossesses triples alors que, dans les grossesses spontanées, les chiffres sont respectivement de 3 % et 0,01 %. De plus, le pourcentage de triplés est artificiellement faussé par la pratique de la réduction embryonnaire. Aujourd'hui la réduction embryonnaire est proposée avec insistance pour les grossesses de rang supérieur ou égal à 4. Elle devient plus discutée pour les grossesses triples, du fait des progrès réalisés dans la prise en

charge obstétrico-pédiatrique des grossesses multiples [19].

Les grossesses multiples sont induites par le transfert de plusieurs embryons destinés à compenser les faibles taux d'implantation embryonnaire. Certains pays se sont opposés aux transferts multiples en limitant juridiquement à deux le nombre maximal d'embryons transférés. En France, la limitation du nombre d'embryons à transférer est recommandée par le guide des bonnes pratiques médicales (1999). Si l'ensemble des praticiens de l'AMP est censé se conformer à ce guide, les modalités de contrôle d'application de ces pratiques ne sont pas encore bien définies. Les complications maternelles et pédiatriques entraînées par les grossesses multiples restent aujourd'hui le point noir des

techniques d'AMP, auxquels s'ajoutent les coûts exorbitants de leur prise en charge obstétricale et pédiatrique. En Angleterre, une récente évaluation démontre que la totalité des coûts de prise en charge des grossesses multiples induites par les traitements de la stérilité équivaut à la totalité des coûts de la prise en charge de la stérilité elle-même. Cette constatation est d'une importance capitale dans un pays où, contrairement à la France, la stérilité est rarement couverte par l'équivalent britannique de la sécurité sociale.

En France, si les coûts ne sont pas parfaitement établis, un rapport récent réalisé par l'INSERM sur la grande prématurité montre que 7 % des grand prématurés proviennent des naissances multiples obtenues après AMP, alors que celle-ci est à l'origine de moins de 1 % seulement des naissances en France [20]. Il faut toutefois préciser qu'une part importante de ces grossesses multiples provient des stimulations de l'ovulation hors FIV.

La deuxième grande complication de la FIV est le syndrome d'hyperstimulation ovarienne. Il s'agit en fait, soit d'un excès de stimulation d'un traitement mal surveillé, soit d'une réponse exagérée au traitement malgré la réalisation d'un monitoring attentif. Plusieurs stades ont été décrits allant du plus bénin, augmentation de la taille des ovaires, au plus sévère, heureusement rare, très gros ovaires avec défaillance multi-systémique et épanchements des séreuses (ascite, épanchement pleural et péricardique, troubles thromboemboliques, défaillance rénale, etc.) Dans les cas les plus graves, des décès, exceptionnels, ont été observés. Les formes moyennes, demandant néanmoins une surveillance hospitalière du fait de l'ascite importante et des troubles hydro-électrolytiques, surviennent dans 1 % à 3 % des cas. La physiopathologie de ce syndrome reste mal connue [21].

En dehors de ces deux complications majeures, de nombreux effets secondaires obèrent les traitements hormonaux. Ils comprennent l'ensemble des effets de la déplétion hormonale entraînée par les agonistes du GnRH qui provoquent une « ménopause » chimique (bouffées de chaleur, maux de tête, sécheresse vaginale, modification de la libido) auxquels viennent s'ajouter les effets de la stimulation

ovarienne, avec pesanteur pelvienne, prise de poids, etc.

Il ne faudrait pas omettre le retentissement psychologique inévitable de ces traitements. Les Anglo-Saxons ont merveilleusement qualifié la FIV de « montagne russe émotionnelle » (*emotional roller-coaster*), image qui résume parfaitement la succession de joies et de peines, au rythme des bonnes et des mauvaises nouvelles. Il s'y surajoute une angoisse et un retentissement non négligeable sur la vie professionnelle, ne serait-ce que par les absences liées aux multiples déplacements. Enfin, le sentiment de culpabilité du conjoint stérile, l'éventuel ressentiment de celui qui ne l'est pas, l'irruption de l'équipe médicale dans l'intimité du couple ont de sérieuses conséquences sur l'équilibre de celui-ci.

La loi de bioéthique

Souvent à la une de l'actualité du fait des débordements de certains, l'AMP est probablement la pratique médicale la plus contrôlée en France depuis son encadrement par la loi de bioéthique (assortie de nombreux décrets d'application). Cette loi fixe un cadre strict à la prise en charge des couples, imposant par exemple une durée de vie commune d'au moins deux ans aux couples non mariés. Elle exclut la prise en charge des femmes en post ménopause, des femmes seules, et des couples d'homosexuelles. Le don d'ovocytes est lui-même fortement réglementé : les locaux dans lesquels se déroulent les actes médicaux ainsi que les médecins qui les pratiquent sont soumis à agrément. De plus, chaque modalité fait l'objet d'une autorisation spécifique (prélèvement ovocytaire pour FIV, prélèvement ovocytaire pour don, prélèvement de spermatozoïdes, actes biologiques). L'activité de préparation du sperme en vue d'une insémination artificielle, auparavant ouverte à tous les laboratoires, ne peut plus être faite aujourd'hui que dans des laboratoires ayant reçu un agrément spécifique. De même, les études sur les gamètes et l'embryon font l'objet de réglementations rigoureuses. La recherche sur l'embryon est interdite à ce jour, de même que le développement *in vitro* d'embryons non destinés à un transfert.

L'assistance médicale à la procréation de demain

La congélation ovocytaire

Si la congélation de sperme existe depuis près de 30 ans et a fait la preuve de son efficacité, la congélation ovocytaire reste encore très imparfaite. De rares grossesses ont été obtenues au cours de ces dernières années, et ce n'est que très récemment que quelques équipes ont pu obtenir des résultats reproductibles [22]. De nombreux ovocytes ne résistent pas aux processus de congélation/décongélation et des progrès restent à faire pour proposer cette méthode en routine. Elle aurait cependant un grand intérêt pour la conservation des gamètes féminins. Elle pourrait être proposée aux femmes exposées à des traitements potentiellement stérilisants et pourrait aussi servir à constituer des banques ovocytaires comme il existe aujourd'hui des banques de sperme. Ces banques pourraient alors être utilisées dans la pratique du don d'ovocytes.

La congélation ovarienne

Si la congélation ovocytaire permet, imparfaitement, de conserver les gamètes féminins, les expériences menées sur la congélation de tissu ovarien visent aussi à conserver des follicules primordiaux en vue d'une greffe ultérieure. Il pourrait alors reprendre ses fonctions, assurant à la fois la production des gamètes mais aussi les sécrétions hormonales essentielles de l'ovaire. Chez certaines espèces animales (rongeurs, brebis), des grossesses ont ainsi été obtenues [23]. Chez la femme, la première greffe a été rapportée au dernier congrès de l'Association Américaine d'Étude de la Reproduction, en octobre 1999 (Oktay *et al.*, communication personnelle). Les résultats portent sur une seule patiente chez laquelle la greffe de 80 microfragments ovariens a permis le développement d'un seul follicule avec une stimulation ovarienne. La qualité de l'ovocyte contenu dans ce follicule n'a pas été évaluée. Ces résultats, préliminaires et relativement médiocres, doivent être analysés avec prudence, mais ils offrent incontestablement

des perspectives intéressantes [24]. Le bénéfice d'une telle technique pour des patientes devant subir une radiothérapie ou une chimiothérapie potentiellement castratrice est évident. Si l'ovaire ne contient aucune cellule cancéreuse, le tissu pourrait être greffé après les traitements ou servir à recueillir les follicules qu'il contient et à réaliser une AMP. La congélation ovarienne pourrait aussi permettre de repousser la ménopause, perspective inquiétante si elle devait repousser la possibilité de reproduction à des âges avancés, mais intéressante si elle pouvait supprimer le traitement substitutif recommandé actuellement chez les femmes après la ménopause.

La maturation *in vitro*

Le prélèvement d'un ovocyte immature et la possibilité de lui faire parcourir *in vitro* l'ensemble des étapes de sa maturation nucléaire et cytoplasmique serait une innovation très importante dans le domaine de l'AMP. Les patientes ne seraient plus exposées aux traitements de stimulation et subiraient simplement une ponction folliculaire. Les ovocytes immatures ainsi collectés seraient cultivés *in vitro*. Cette technique pourrait également être appliquée aux tissus ovariens d'où l'on pourrait extraire les follicules. Des expériences sont actuellement en cours chez l'animal sur la culture de follicules primordiaux entiers [25]. Récemment une équipe américaine a pu obtenir, chez la souris, une ovulation sur des follicules pré-antraux cultivés *in vitro* (H. Liu *et al.*, résultats non publiés). Dans l'espèce humaine, plusieurs groupes travaillant sur la maturation *in vitro* ont pu obtenir des ovocytes matures et des embryons, mais les taux de succès restent très faibles [26, 27]. Si les étapes de la maturation nucléaire semblent s'effectuer sans difficulté, c'est la maturation cytoplasmique qui est altérée et les connaissances sur les critères de qualité du cytoplasme sont pour l'instant pratiquement inexistantes.

La simplification des traitements

La fécondation *in vitro*, les protocoles de stimulation ovarienne associent aujourd'hui les gonadotrophines aux

agonistes du GnRH (GnRH- α). Ils permettent une croissance multi-folliculaire, en sauvant de l'atrésie la plupart des follicules de la cohorte ayant débuté leur croissance. Les GnRH- α entraînent une désensibilisation hypophysaire aboutissant à l'effondrement de la sécrétion des gonadotrophines et à la suppression des ovulations prématurées. Néanmoins les GnRH- α allongent la période de traitement, exposent la patiente à des effets secondaires de type ménopausique, augmentent l'incidence du syndrome d'hyperstimulation ovarienne et la consommation de gonadotrophines exogènes. Malgré ces inconvénients, les avantages sont importants et près de 90% des cycles de FIV sont réalisés avec GnRH- α . Une nouvelle classe de médicaments, les antagonistes du GnRH, a récemment fait son apparition dans le domaine de la procréation. L'administration de l'antagoniste du GnRH provoque une chute brutale des gonadotrophines. Du fait de la dépendance du pic ovulatoire à la GnRH, elle prévient ou interrompt le pic de LH [28]. L'introduction des antagonistes du GnRH supprime le recours aux GnRH- α . Elle permet de développer des modes de stimulation moins sujets aux effets secondaires et de privilégier la qualité plutôt que la quantité [29, 30]. Le recours au cycle naturel par exemple, très vite abandonné en FIV à cause des mauvais résultats et de la fréquence élevée d'annulations due au pic prématuré de LH, pourrait être remis au goût du jour [31]. Il existe aujourd'hui une forte demande pour diminuer l'intensité des protocoles de stimulation ovarienne [32].

Conclusions

L'AMP a connu, en 20 ans, des développements considérables et les perspectives des progrès attendus à plus ou moins court terme élargiront encore les indications thérapeutiques. Les techniques aujourd'hui disponibles peuvent apporter une solution à presque toutes les formes de stérilité. Malgré les effets secondaires, les contraintes et le poids psychologique des traitements, l'AMP permet chaque jour à de nombreux couples de réaliser leur vœu le plus cher. Plus de 700 000 enfants ont été conçus dans

le monde grâce à la FIV. Si cette spécialité n'est pas exempte de dérives qui semblent parfois transgresser l'éthique ou la morale, sa pratique est réglée et contrôlée dans de nombreux pays et en France tout particulièrement. Le sensationnalisme médiatisé de certaines « premières médicales » reste relativement marginal. Les progrès à brève échéance portent sur la mise au point de nouvelles méthodes ou l'amélioration des techniques existantes. Les progrès à plus long terme concernent la compréhension de l'extraordinaire complexité de la procréation dans l'espèce humaine. Une meilleure connaissance de la physiologie de la production des gamètes et des mécanismes de l'implantation pourrait amener à mieux répertorier les étiopathologies des stérilités et ouvrir la voie à une prise en charge plus spécifique. Elle diminuerait la médicalisation aujourd'hui excessive des techniques de l'AMP et soulagerait les couples stériles du poids considérable des traitements actuels ■

RÉFÉRENCES

1. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 12: 366.
2. Staessen C, Nagy ZP, Liu J, Janssenswillen C, Camus M, Devroey P, Steirteghem AC. One year's experience with elective transfer of two good quality embryos in the human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection programmes. *Hum Reprod* 1995; 10: 3305-12.
3. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 4: 17-8.
4. Van Steirteghem A, Nagy P, Joris H, et al. Results of intracytoplasmic sperm injection with ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13 (suppl 1): 134-42.
5. Sousa M, Barros A, Takahashi K, Oliveira C, Silva J, Tesarik J. Clinical efficacy of spermatid conception: analysis using a new spermatid classification scheme. *Hum Reprod* 1999; 14: 1279-86.
6. Tesarik J, Greco E. Assisted reproduction for testicular failure: management of germ cell maturation arrest. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999; 11: 283-8.
7. Luetjens CM, Payne C, Schatten G. Non-random chromosome positioning in human sperm and sex chromosome anomalies following intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1999; 10: 1240.

8. Meshede D, Horst J. Sex Chromosomal anomalies in pregnancies conceived through ICSI: a case for genetic counselling. *Hum Reprod* 1997; 12: 1125-7.
9. Reubinoff BE, Abeliovich D, Werner M, Schenker JG, Safran A, Lewin A. A birth in non-mosaic Klinefelter's syndrome after testicular fine needle aspiration, intracytoplasmic sperm injection and preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 1998; 13: 1887-92.
10. Thielemans BF, Spiessens C, D'Hooghe T, Vanderschueren D, Legius E. Genetic abnormalities and male infertility. A comprehensive review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 81: 217-25.
11. Bonduelle M, et al. Prospective follow-up study of 877 children born after ICSI with ejaculated, epididymal and testicular spermatozoa and replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod* 1996; 11: 131-55.
12. Kurinczuk JJ, Bower C. Birth defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection: an alternative interpretation. *Br Med J* 1997; 15: 1260-6.
13. Bowen JR, Gibson FL, Leslie GI, Saunders DM. Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1998; 23: 1529-34.
14. Bonduelle M, Joris H, Hofmans K, Liebaers I, Van Steirteghem A. Mental development of 201 ICSI children at 2 years of age. *Lancet* 1998; 23: 1553.
15. Thepot F, Julliard JC. Results on medically assisted reproduction with gamete cryopreservation and donation. French Federation of CECOS. *Contracept Fertil Sex* 1999; 27: 452-6.
16. Cornet D. Can we define the indications for oocyte donation? *Contracept Fertil Sex* 1997; 25: 654-6.
17. Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Taylor S, De Ziegler D, Frydman R. Uterine contractions at the time of embryo transfer alter pregnancy rates after *in vitro* fertilization. *Hum Reprod* 1999; 13: 1968-74.
18. FIVNAT. Influence du rang de la tentative. *Contracept Fertil Sex* 1998; 26: 466-72.
19. Kadhel P, Olivennes F, Fernandez H, Vial M, Frydman R. Are there still obstetric and perinatal benefits for selective embryo reduction of triplet pregnancies? *Hum Reprod* 1998; 13: 3555-9.
20. Grande prématurité. Dépistage et prévention du risque. Expertise collective INSERM. Paris: Editions INSERM, 1997.
21. Schenker JG. Clinical aspects of ovarian hyperstimulation syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 85: 13-20.
22. Tucker MJ, Morton PC, Wright G, Sweitzer CL, Massey JB. Clinical application of human egg cryopreservation. *Hum Reprod* 1998; 13: 3156-9.

RÉFÉRENCES

23. Aubard Y, Piver P, Cogni Y, Fermeaux V, Poulin N, Driancourt MA. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep. *Hum Reprod* 1999; 14: 2149-54.

24. Oktay K, Newton H, Aubard Y, Salha O, Gosden RG. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertil Steril* 1998; 69: 1-7.

25. Cortvrindt RG, Hu Y, Liu J, Smits JE. Timed analysis of the nuclear maturation of oocytes in early preantral mouse follicle culture supplemented with recombinant gonadotropin. *Fertil Steril* 1998; 70: 1114-25.

26. Mermillod P, Marchal R. Oocyte of domestic mammals: a model for the study of *in vitro* maturation. *Contracept Fertil Sex* 1999; 27: 440-8.

27 Russell JB Immature oocyte retrieval with *in-vitro* oocyte maturation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999; 11: 289-96.

28. Bouchard P, Charbonnel B, Caraty A, et al. The role of GnRH during the periovulatory period: a basis for the use of GnRH antagonists in ovulation induction. In: Filicori M, Flamigni C, eds. *Ovulation: Basic Science and Clinical Advances*. Amsterdam: Elsevier Science BV International Congress Series, 1994: 1046.

29. Diedrich K, Diedrich E, Santos E, et al. Suppression of the endogenous LH-surge by the GnRH-antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1994; 9: 788-91.

30. Olivennes F, Alvarez S, Bouchard P, Fanchin R, Salat-Baroux J, Frydman R. The use of a new GnRH antagonist (Cetrorelix) in IVF-ET with a single dose protocol: a dose finding study of 3 versus 2 mg. *Hum Reprod* 1998; 13: 2411-4.

31. Rongières-Bertrand C, Olivennes F, Righini C, Fanchin R, Bouchard P, Frydman R. Revival of the natural cycle in IVF-ET with the use of a new LH-RH antagonist. *Hum Reprod* 1999; 14: 683-8.

32. Olivennes F, Frydman R. « Friendly IVF » the way of the future? *Hum Reprod* 1998; 13: 1121-4.

MS2000

Summary

***In vitro* fertilization and embryo transfer: present and future aspects**

In the past 20 years, important progress has been accomplished in the *in vitro* fertilization (IVF) technique. A treatment can be proposed in almost all the aetiologies of infertility. Beside the classical *in vitro* fertilization, the breakthrough of intra-cytoplasmic spermatozoa injection (ICSI) has revolutionized the management of male infertility. Today, pregnancies can be achieved with a single spermatozoa which can be obtained in the epididymis or even in the testicular tissue. Ovarian stimulation is mandatory for IVF and leads to complications and side-effects. The transfer of more than one embryo increases the chance of pregnancy, but is followed by a higher incidence of multiple pregnancies with adverse obstetrical and paediatric outcome. Most of the follow up studies of children conceived with ICSI have found malformation rates and developmental index comparable to those observed in the overall population. One of the problems is the increased incidence of chromosomal abnormalities in male infertility. A small increase in the sex chromosome abnormalities has been reported. More recently, microdeletions of the Y chromosome have been linked to male infertility and the potential trans-

mission of the defects to the male decendance should be taken into account. Eggs donation is proposed to women with absent or inactive ovaries. The oocytes of young and fertile donors allow the occurrence of pregnancies in these patients. In France, the Bioethic Law of 1994 have put the practice of egg donation under heavy regulations. Egg donation should be free of charge and fees, anonymous and the obtained embryos must be frozen for a period of 6 months to allow the control of the HIV and Hepatitis tests. This mandatory freezing/thawing procedure ensures a complete viral safety but clearly reduces the success rate of the procedure. Assisted reproductive technologies are now regulated by the French Bioethic Law. All the centers should be authorized as well as the clinicians and embryologists who receive a specific authorization to each available techniques. In the near future, progresses will concern the oocytes and ovarian tissue freezing, *in vitro* maturation of oocytes and embryos. There is also a clear demand for simplification of the current stimulation regimens to diminish the side-effects, the complications and the heavy psychological impact of the assisted reproduction techniques.