



Rapport du groupe de travail sur l'assistance médicale à la procréation*

Données générales sur la pratique de l'AMP en France

Un gros effort de collecte des données sur les activités de l'AMP en France a été entrepris depuis plusieurs années, d'une part, dans le domaine de l'insémination artificielle avec donneur (IAD), grâce à l'action des Centres d'études et de conservation du sperme (CECOS), d'autre part, dans le domaine de la FIV (fécondation *in vitro*) grâce au GEFF (Groupe d'études de la fécondation *in vitro* en France) et de l'Association FIVNAT. Les données, maintenant centralisées par FIVNAT, sont obtenues sur une base de volontariat des centres de l'AMP (environ 100 centres en 1992) et sont analysées par l'Unité 292 de l'Inserm.

Le nombre d'enfants nés après IAD est d'environ 1 500 par an et après FIV d'environ 4 500, représentant, ces dernières années, près de 1 % des naissances. Ces chiffres montrent tout le bienfait que ces méthodes ont apporté aux couples inféconds. Dans le domaine de la FIV, l'analyse porte, aujourd'hui, sur plus de 100 000 fiches de ponctions (le point de départ de toutes les analyses est la ponction pratiquée chez une femme en vue du prélèvement d'ovocytes). Dans cette étude, les informations concernent environ 8 000 grossesses cliniques et 6 000 accouchements.

Une première question se pose : que représente l'étude FIVNAT par rapport à l'ensemble des activités de

FIV en France ? Au cours des précédentes années, on a noté une différence entre les chiffres d'activité recensés par le GEFF et par FIVNAT. Ainsi, en 1987, le GEFF a recensé 24 000 ponctions, FIVNAT 15 000 ; en 1991 : le GEFF 27 000, FIVNAT 19 500. Cette différence devrait se réduire dans les prochaines années grâce à un meilleur recueil des données. On estime qu'actuellement le recueil des données couvrirait 90 % des centres en activité.

Évolution dans le temps des activités de FIV (bilan FIVNAT)

Cette évolution est marquée par une augmentation régulière du nombre annuel de ponctions recensées, passant de 15 000 en 1987 à 19 500 en 1991. Sur le plan technique, la technique classique de FIVETE (fécondation *in vitro* et transfert de l'embryon) reste prédominante. Les autres techniques, présentées à un moment comme une amélioration – le GIFT (*gamete intra fallopian transfert*) et la ZIFT (*zygote intra fallopian transfert*) –, sont pratiquement abandonnées.

Sur le plan des indications, on note une évolution. (1) Les indications tubaires, qui ont été la raison même du développement de la FIV, sont restées stables en chiffre absolu. Les indications tubaires isolées représentent chaque année 7 500 à 8 000 ponctions. En 1988, elles représentaient 48,3 % des indications et, en 1992, seulement 38,6 %. Les chiffres sont de 68 % en 1988 et de 59 % en 1992, si l'on recense les

* Rapporteurs : A. Boué, S. Novaes.
Membres du groupe de travail : R. Dufourt,
N. Echard, A. Kahn, J. Michaud,
Y. Roudy.

Ont été consultés :

M.O. Alnot, N. Athéa, M. Dehan,
R. Frydman, C. Humeau, F. Kuttenn,
H. Léridon, J. Mandelbaum, J. Montagut,
C. Moraine, M. Plachot, J. Testard,
F. Thépot, C. Thibault.

indications tubaires associées à d'autres indications, en particulier masculines. Il faut souligner que les lésions des trompes ne sont définitives que dans un peu plus de la moitié des indications tubaires. (2) L'augmentation du nombre des ponctions résulte, surtout, de l'augmentation de deux indications : les indications masculines, fécondation *in vitro* avec le sperme du conjoint (16,4 % en 1992) ou de donneur (5,2 % en 1992) ; et les indications de stérilité idiopathique (13,7 % en 1992) : sous ce terme, sont regroupées des stérilités de plus de deux ans, sans cause identifiée.

Les résultats

Il faut d'abord préciser les paramètres d'évaluation des résultats. Dans les documents FIVNAT, le dénominateur est précis : c'est le nombre de ponctions, en vue du recueil des ovocytes. Quant au numérateur il peut être le nombre de ponctions positives (actuellement ce chiffre est supérieur à 98 %), de transferts d'embryons (ce chiffre avoisine 80 %), de grossesses cliniques (c'est-à-dire un état de grossesse défini par un examen échographique ou par un dosage biochimique, taux d'hCG supérieur à 1 000 UI/l), d'accouchements et, enfin, le nombre d'enfants vivants. C'est souvent le nombre de grossesses cliniques qui a été utilisé pour évaluer les résultats, avec des variations importantes selon que le nombre de grossesses est rapporté au nombre de ponctions ou au nombre de transferts. L'évaluation de la FIV, basée sur le nombre des grossesses, est utile dans le cadre des activités d'un centre, pour un suivi des activités. Il faudrait tenir compte du taux de grossesses interrompues (5 % de grossesses extra-utérines ; 25 % d'avortements spontanés, 2,4 % de réductions embryonnaires). Maintenant que le recul est suffisant pour réaliser une analyse statistique, il serait préférable dans les communications scientifiques, et surtout médiatiques, d'évaluer les résultats par le nombre d'accouchements

avec au moins un enfant normal vivant. En 1990 et 1991, ce taux de succès était de 13,7 % par rapport aux ponctions ; il était peut-être légèrement supérieur en 1992. On retrouve des chiffres voisins dans des études étrangères : 14 % aux États-Unis et 12,5 % en Grande-Bretagne. Pour évaluer les résultats de l'AMP, il faudrait améliorer le recueil des données sur les accouchements et l'état des enfants. Un tel effort est réalisable, comme le montrent les études des CECOS. En 1991, sur 1 700 grossesses après IAD, les résultats et l'état des enfants ne sont inconnus que pour seulement 1,3 % des cas. Des résultats équivalents sont obtenus pour la FIV avec sperme de donneur, grâce à l'action des CECOS. En revanche, sur l'ensemble des données FIVNAT, plus de 40 % des dossiers de grossesses après FIV et de leurs résultats échappent au recueil. Il est possible que la lourdeur du document à remplir ait eu un effet dissuasif sur les centres de PMA.

Il faut rappeler l'objectif de la PMA : la naissance d'un enfant sain. Le meilleur critère de succès est l'enfant qui rentre à la maison avec sa mère après l'accouchement (*take home baby rate*). L'analyse des résultats de la FIV montre des variations dans le taux de succès. Il est d'abord fonction de l'âge de la mère. Une étude anglaise (groupe de R. Edwards) récente montre qu'au-dessous de 35 ans le taux de succès pour un cycle de traitement, évalué sur le nombre d'accouchements, est de 12 % à 14 % ; on peut espérer, après cinq cycles de traitement, un succès de 45 % ; de 35 à 39 ans, le taux de succès pour un cycle est de 7,7 % et de 29 % pour cinq cycles ; à 40-45 ans, le taux de succès pour un cycle n'est plus que de 2,8 % et de 14 % pour cinq cycles. Les calculs pour cinq cycles sont biaisés du fait des abandons, ce qui entraîne une sélection des meilleures indications. On ne possède pas d'études prospectives analysant, pour une même femme, la succession des tentatives, les abandons, les grossesses spontanées, les naissances. Le taux de suc-

cès varie peu en fonction des différentes indications, à l'exception de celles où la fécondation est réalisée avec un sperme de donneur, pour lesquelles les résultats sont meilleurs. Un élément influe beaucoup sur le taux de succès, c'est le nombre des embryons transférés. Cet élément fait l'objet de la deuxième partie du rapport.

L'analyse des données des CECOS apporte d'autres informations. (1) Sur les embryons congelés : dans le cadre des CECOS, de 1985 à 1991, plus de 22 000 embryons ont été congelés pour 5 500 couples ; parmi ces embryons, 15 000 ont été décongelés. En 1992, 6 500 embryons ont été congelés pour 1 400 couples et 3 800 décongelés. Il restait « en garde » environ 9 000 embryons. On ne possède pas de données en dehors des CECOS. Le nombre total annuel d'embryons congelés serait voisin de 30 000. Le nombre d'embryons « en garde » est supérieur à ce chiffre. On ne dispose pas d'analyse sérieuse du taux de succès du transfert des embryons après décongélation. Il semble que de très importantes variations soient observées par les différentes équipes, selon les modes de congélation, le taux moyen de succès étant très faible. (2) Sur les dons d'ovocytes : quelques centres ont offert la possibilité d'un don d'ovocytes à des couples demandeurs. Deux cent cinquante couples ont été suivis en 1990-1991. A l'issue de ces tentatives, il y a eu 5 naissances en 1990, 7 en 1991 et 3 en 1992.

La stimulation ovarienne et ses conséquences

Dans les conditions physiologiques, un seul ovocyte mûr est émis à chaque cycle menstruel. Depuis plus de trente ans se sont développés des protocoles médicamenteux actifs sur l'ovulation. Ces méthodes ont d'abord été utilisées pour améliorer la procréation naturelle en induisant une ovulation qui n'existait pas, ou en espérant améliorer la qualité d'une ovulation. Avec le développement de la FIV, ces méthodes ont eu

pour but de situer l'ovulation à un niveau supraphysiologique afin de recueillir plusieurs ovocytes, augmentant ainsi les chances de succès. Outre l'âge de la femme, l'élément qui influe beaucoup sur le taux de succès de la FIV est le nombre des embryons transférés. Les résultats, présentés en taux de grossesses cliniques par transfert (le nombre d'accouchements ne figure malheureusement pas dans les documents FIVNAT), passent d'un taux de 9 % pour un embryon transféré, à 18 % pour deux, 26 % pour trois mais n'augmente que très peu au-dessus de trois embryons transférés.

Les protocoles médicamenteux comportent deux phases : une phase de stimulation, visant à amener à maturation plusieurs ovocytes, et une phase de déclenchement de l'ovulation. Cette deuxième phase permet également de programmer le moment de l'ovulation et donc la fécondation *in vitro*, cela dans le cadre d'une activité hospitalière. La panoplie des substances médicamenteuses utilisées et des protocoles de leur utilisation s'enrichit régulièrement, et leur développement a été parallèle à celui de la FIV. Les substances médicamenteuses utilisées dans les protocoles de stimulation de l'ovulation agissent, soit à l'étage hypothalamique (citrate de clomiphène), soit à l'étage hypophysaire (agonistes LH-RH), soit sur l'ovaire lui-même, par l'intermédiaire de gonadotropines (hMG). Le déclenchement de l'ovulation est produit par l'hormone gonadotropine chorionique (hCG). Pour évaluer les résultats et les effets secondaires des méthodes de stimulation ovarienne, on ne dispose de données importantes que dans le cadre de la FIV, grâce en particulier aux enquêtes FIVNAT. En revanche, on ne possède aucune donnée sur la pratique médicale de la stimulation ovarienne en dehors de la FIV : on n'en connaît ni l'importance numérique, ni les résultats, ni les complications. La mise au point de protocoles thérapeutiques dans le cadre de la FIV a augmenté les prescriptions des praticiens qui subissent la pression des

femmes, anxieuses après quelques mois d'insuccès dans leurs projets de conception, et des firmes productrices de ces médicaments qui diffusent aux praticiens les protocoles mis au point pour la FIV. Les chiffres de vente de l'hMG sont passés de 500 000 ampoules en 1985 à environ 3 000 000 d'ampoules en 1992. On pense qu'environ 2 000 000 de ces ampoules ont été prescrites en dehors de la FIV, ce qui représenterait le traitement de 30 000 à 50 000 femmes. La surveillance médicale (dosages hormonaux et échographie) risque d'être moins rigoureuse, et, dans une fécondation *in vivo*, il est impossible de limiter le nombre des ovocytes qui seront fécondés et s'implanteront.

Les complications des traitements de stimulation de l'ovulation peuvent concerner : (1) la femme elle-même, avec des conséquences immédiates, actuellement bien connues, et des conséquences lointaines, encore difficiles à apprécier ; (2) les produits de la conception ; les risques sont, ici, liés aux grossesses multiples, avec leurs conséquences sur le déroulement de la grossesse et, après la naissance, sur l'état de l'enfant.

Chez la femme

1. Le syndrome d'hyperstimulation ovarienne est une manifestation pathologique ovarienne iatrogène, induite par les inducteurs : l'augmentation de la taille ovarienne avec kystes multiples. Quelques formes sévères existent qui induisent des phénomènes d'hémoconcentration et d'accumulation liquidienne (ascite) ; le pronostic vital peut être menacé. Ce syndrome atteint un degré modéré dans environ 6 % des cas, mais un degré sévère, dans environ 1 % à 2 % des cas, nécessitant alors une hospitalisation et des soins importants, voire une réanimation. Cette réponse ovarienne exacerbée s'observe surtout chez les femmes jeunes et, de ce fait, est plus fréquente dans les prescriptions hors FIV.

2. Les conséquences lointaines sont

plus difficiles à apprécier, car le recul est relativement court depuis la généralisation des pratiques de FIV. Il n'y a aucune étude épidémiologique chez les femmes ayant eu des stimulations ovariennes en dehors de la FIV. L'hyperstimulation ovarienne est peu physiologique et on évoque les conséquences possibles au niveau de l'ovaire, des cicatrices qui peuvent donner une dystrophie ovarienne. On a aussi évoqué le rôle des hyperstimulations dans le développement d'endométriotes. Un risque de ménopause précoce a également été suggéré mais n'a pas encore fait l'objet d'étude épidémiologique. L'événement récent dans ce domaine est l'annonce d'une augmentation de la fréquence du cancer de l'ovaire et des tumeurs de la granulosa chez des femmes ayant eu une hyperstimulation ovarienne. Le risque pourrait être multiplié par 5 ou 6 selon certaines études. Il faut signaler que, dans la population générale, il s'agit de cancers relativement rares. Si ces thérapeutiques doubleraient l'incidence de ces cancers, cela représenterait 600 cancers par an, de mauvais pronostic. Un lien entre le nombre cumulé d'ovulations et le risque d'apparition de ce cancer a été précédemment rapporté. De nombreux praticiens ont remarqué la survenue fréquente de cancer du sein, avec des formes graves chez des femmes jeunes. Les connaissances sur la genèse du cancer du sein et son hormonodépendance laissent à penser que les stimulations de l'ovulation pourraient jouer un rôle. Des études épidémiologiques rigoureuses sont absolument indispensables, mais elles seront longues et difficiles. Dès maintenant, il convient de tenir compte de ces risques potentiels dans les indications d'hyperstimulation ovarienne, en particulier en dehors de la FIV, chez des femmes jeunes qui n'ont qu'une hypofécondité à laquelle s'ajoute l'impatience de concevoir un enfant. Une bonne information des praticiens devrait éviter l'excès de ces traitements. Est-il besoin de rappeler que, dans un passé récent, la prescription abusive

de diéthylstilbœstrol (Distilbène®) a eu des conséquences lointaines dramatiques sur les filles exposées *in utero* à ce produit.

Le problème des grossesses multiples

C'est le problème médical le plus immédiatement visible et qui est grave pour la mère et pour les enfants. On ne dispose d'informations que sur les naissances vivantes. L'enquête FIVNAT montre qu'après FIV 27,4 % des grossesses sont multiples (23 % de jumeaux, 4 % de triplés), c'est-à-dire que 133 enfants naissent pour 100 accouchements. Les études démographiques de l'ensemble de la population ont montré que la fréquence des grossesses multiples augmente régulièrement depuis 1972, et surtout depuis 1984. Pour l'ensemble de la population, l'incidence des jumeaux est passée de 8,8 pour mille en 1972 à 12,1 en 1990, soit une augmentation de 37 %. Plus spectaculaire encore est l'augmentation des triplés, passant, pour l'ensemble des naissances, de 0,9 pour dix mille en 1972 à 4,4 % en 1989, soit une augmentation de plus de 450 %. Une évolution similaire a été observée au Royaume-Uni, aux États-Unis et en Australie. D'après ces chiffres et les résultats de l'enquête FIVNAT, la FIV est responsable d'environ 25 % de ces grossesses multiples et les indications médicales de stimulation ovarienne de plus de 50 %.

On peut noter que la courbe ascendante des naissances de triplés, qui s'est accélérée de 1984 à 1989, est parallèle à la courbe ascendante des ventes d'hormone hMG dont le rôle dans la survenue de grossesses multiples a été démontré. La gravité des grossesses multiples, pour la femme enceinte, pour les enfants, et ensuite pour la famille, pose un vrai problème médical. La grossesse multiple est une grossesse à risque, avec une augmentation notable de toutes les complications de la grossesse (toxémie, menace d'accouchement prématuré, cerclage du col, rupture prématurée des membranes, recours à la césari-

enne). Le risque pour l'enfant s'aggrave avec le nombre. Dans la FIV, la prématurité passe de 9 % avec un seul enfant (chiffre supérieur au chiffre de la prématurité dans la population générale qui est d'environ 5 %), à 90 % chez les triplés. Ainsi, sont transférés dans un service de néonatalogie ou de soins intensifs 11 % des enfants uniques, 42 % des jumeaux et 89 % des triplés. La mortalité infantile est trois fois plus élevée chez les jumeaux et treize fois plus élevée chez les triplés que chez les enfants uniques. Il faudrait aussi pouvoir évaluer les séquelles lointaines, en particulier chez les enfants prématurés. On sait que, parmi les enfants nés avant 31 semaines, 10 % à 25 % présenteront des séquelles, dont la moitié entraînera un handicap sévère. Dans les résultats de la FIV, ces grands prématurés représentent 5 % des jumeaux et 24 % des triplés. Une étude australienne récente montre qu'à l'âge d'un an, l'infirmité motrice cérébrale (IMC) est huit fois plus fréquente chez les jumeaux et quarante fois plus fréquente chez les triplés. Ces résultats montrent que sur 100 enfants qui naissent après FIV, 29 séjourneront en néonatalogie (21) ou en réanimation (8) ; 3 décéderont, 4 à 5 seront de grands prématurés. Ces chiffres représentent plus de trois fois l'incidence observée après les grossesses hors FIV. Il convient aussi de rappeler les problèmes psychologiques, sociaux et économiques rencontrés par les mères ayant à élever des jumeaux et, surtout, des triplés. Il faut insister sur le fait que les résultats disponibles aujourd'hui ne concernent que les grossesses multiples ayant évolué jusqu'à la naissance. On n'a aucune évaluation de la fréquence des grossesses multiples dès leur début et de leur devenir, en particulier dans les cas de stimulations ovariennes en dehors de la FIV. On connaît déjà les problèmes posés par les réductions embryonnaires présentées comme un palliatif à ces grossesses multiples (avis du CCNE du 24 juin 1991). L'enquête FIVNAT rapporte une réduction embryonnaire

re dans 2,4 % des grossesses ayant conduit à une naissance. On ne connaît pas le nombre de réductions embryonnaires ayant provoqué l'arrêt de la grossesse.

Devant la fréquence des grossesses multiples et la gravité de leurs conséquences, les centres de FIV ont tenté d'en réduire le nombre. Déjà depuis trois ans on observe une diminution modérée du nombre des embryons transférés : en 1988 et 1989, il y avait transfert de 4 embryons ou plus dans 38 % des cas ; en 1990 : 32 % ; en 1991 : 25 % ; en 1992 : 23 %. Une analyse FIVNAT a montré que les facteurs qui ont le plus d'influence sur la fréquence des grossesses multiples étaient le nombre d'embryons transférés et l'âge de la femme. A partir de ces données, cette association propose une conduite qui permettrait de ne pas dépasser le seuil de 3 % de grossesses triples ou plus. Cet objectif est insuffisant, il faudrait parvenir à ne pas dépasser 1 % de grossesses triples. Au Royaume-Uni, le code de bonne pratique de *Human fertilization and embryology authority* limite le nombre d'embryons transférés à trois. Déjà certains centres (Winston à Hammersmith, Schoysman en Belgique, et quelques centres français) se limitent à deux embryons et ont réduit la naissance des triplés à 1 %. Dans ce domaine, une réelle discussion s'est ouverte et un choix éthique doit être fait entre, d'une part, le taux de succès de la FIV et ses tentatives de record et, d'autre part, les graves conséquences de grossesses multiples dont la fréquence constitue, en elle-même, un record qu'il vaudrait mieux éviter.

En 1991, les marchés liés à l'activité de FIV pour la France ont représenté environ un milliard de francs pour un nombre d'enfants qui doit se situer autour de 4 000. Parmi ceux-ci, environ 900 ont été hospitalisés à la naissance en néonatalogie ou réanimation. Les évaluations financières du coût de cette pratique devraient tenir compte du surcoût des soins à ces enfants. Faut-il rappeler qu'une journée d'hospitalisation dans un service de réanimation néo-

natale coûte environ 8 000 F et que, pour un enfant de moins de 1 500 g, le coût moyen total est évalué à 450 000 F.

Les recherches en cours dans l'AMP

Certaines recherches visant à améliorer les résultats de la FIV sont dirigées vers la fécondation : il s'agit de la fécondation assistée

Dans la fécondation, le spermatozoïde, pour transmettre à l'ovocyte son matériel génétique, doit franchir une première couche de cellules, le *cumulus oophorus*, puis la zone pellucide, enfin la membrane plasmique de l'ovocyte. La zone pellucide représente un obstacle spécifique puisqu'elle ne peut être pénétrée par un spermatozoïde d'une autre espèce.

Les indications de la FIV se sont étendues aux infertilités dans lesquelles un facteur masculin était démontré ou soupçonné. Il peut s'agir d'échecs répétés de la FIV avec un sperme apparemment normal mais où aucun ovocyte n'était fécondé, conduisant à penser que la cause est le non-franchissement de la zone pellucide par les spermatozoïdes, ou d'échecs de FIV avec des spermés anormaux, ou encore de spermés normaux avec agénésies ou obstructions des canaux déférents. Dans ces derniers cas, la FIV n'était pas envisageable avec les méthodes classiques ; de nouvelles méthodes de fécondation assistée pourraient permettre de l'étendre à ces indications. Plusieurs méthodes sont proposées et en cours d'étude : (1) la perforation de la zone pellucide, soit mécanique, soit chimique, soit par un simple « rapage » ; ces techniques sont destinées à faciliter le passage des spermatozoïdes mobiles vers l'ovocyte ; (2) la micro-injection de quelques spermatozoïdes sous la zone pellucide, au contact de la membrane de l'ovocyte (SUZI, *subzonal insemination*) ; (3) l'injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde (ICSI, *intracytoplasmic sperm injection*).

C'est la micro-injection sous la zone pellucide (SUZI) pour laquelle les tentatives ont été les plus nombreuses. S'adressant à des couples ayant eu des échecs de FIV, les résultats apparaissent faibles : un taux de fécondation de 17 %, donc peu d'embryons, et seulement 5 % à 8 % de grossesses cliniques. On dispose de quelques résultats concernant l'état des enfants à la naissance après l'utilisation de la technique SUZI, en particulier ceux de l'équipe de J. Cohen à New York. Avec les critères de malformations retenus pour l'État de New York, il y a, dans la population générale 6,4 % de malformations majeures et mineures, entre 8,2 % après FIV « classique » et 9,5 % après SUZI.

Récemment une équipe belge (Van Steirteghem) a rapporté des résultats très favorables avec la technique ICSI. Leur expérience porte sur 800 ponctions ayant permis le recueil de 7 900 ovocytes. Après micro-injection, 88 % des ovocytes restent intacts, avec présence de deux pronucleus (état diploïde) dans 65 % des ovocytes injectés (résultat plus favorable que celui de la FIV classique). Les taux de succès de grossesses cliniques sont très satisfaisants après le transfert de deux (24 % de grossesses) ou trois embryons (35 % de grossesses). Ces taux de succès permettent à cette équipe de limiter maintenant les transferts à deux embryons, évitant ainsi les grossesses triples. Le caractère récent de ces recherches n'a pas encore permis une analyse de l'état des enfants. La technique ICSI pose trois sortes de problèmes à la pratique de la PMA.

(a) On ne dispose d'aucune étude expérimentale de cette méthode sur des mammifères non humains. Les essais de la technique ICSI sur la souris, le hamster et le lapin ont échoué (en particulier ceux tentés par l'équipe belge en utilisant le protocole humain).

(b) La sélection du spermatozoïde fécondant : la population de spermatozoïdes est toujours une mosaïque. Sur le plan cytogénétique, outre la différence du chromosome sexuel

qui déterminera le sexe de l'embryon, on trouve une proportion non négligeable (environ 7 %) d'anomalies de la structure chromosomique (délétions, translocations...). Sur le plan moléculaire, on connaît des mosaïques germinales qui peuvent être à l'origine de néomutations de maladies monogéniques, en particulier dans les maladies liées au sexe, telles la myopathie de Duchenne et l'hémophilie. Récemment, dans les maladies résultant d'une instabilité moléculaire (allongement d'un triplet), on a observé une grande variété dans les caractéristiques de cet allongement dans le sperme, en particulier dans la chorée de Huntington. Concernant la sélection de spermatozoïdes, de nombreuses questions se posent : que penser du fait qu'un spermatozoïde est prélevé au hasard pour la fécondation, éliminant ainsi la « compétition » habituelle qui a lieu dans les processus de la fécondation naturelle ou de la FIV classique ? On ne dispose d'aucun critère phénotypique pour ce choix, et cela dans une situation où on pense que les spermatozoïdes n'ont pas les qualités fécondantes habituelles puisqu'il y a stérilité masculine. De plus, on ne dispose pas de modèle animal d'hypofécondité due à un défaut dans la spermatogenèse : la sélection dans les élevages a fait que les mauvais reproducteurs ont été éliminés. On peut, d'une part, craindre que des anomalies génétiques, cause de la stérilité masculine, ne soient transmises à la descendance, et, d'autre part, s'interroger sur les conséquences des différentes manipulations subies par les spermatozoïdes, dont l'innocuité n'a pas été démontrée. (c) Les conséquences du franchissement par effraction de la membrane plasmique de l'ovocyte sont un point important à évaluer, et l'on ne dispose pour cela d'aucune expérimentation préalable. Dans le domaine animal, les techniques de transgénèse consistent en l'introduction d'un matériel génétique dans l'œuf fécondé, soit au stade d'une cellule (on injecte de préférence dans le pronoyau paternel), soit au stade de

deux cellules. Ces expériences ont pour but d'obtenir quelques animaux transgéniques et aucune évaluation des autres conséquences de la technique sur l'ensemble des animaux nés après cette manipulation n'a été faite. Des expériences animales récentes de transferts de noyau dans le cytoplasme d'un autre zygote laissent penser que l'environnement cytoplasmique du noyau pourrait avoir des effets à long terme sur le développement. Il s'agit de conditions un peu différentes de celles des injections intraovocytaires. D'après les premiers essais humains, on sait qu'environ un ovocyte sur dix ne survit pas à l'effraction. Mais peut-il exister, pour les ovocytes restés indemnes, d'autres risques aux conséquences fâcheuses ? L'ouverture de la membrane plasmique pourrait favoriser la pénétration d'un matériel étranger (génétique...), le traumatisme de la micropipette pourrait léser des éléments du cytoplasme (membranes, organites...) et entraîner des modifications épigénétiques avec des conséquences sur l'embryogenèse et le développement ; elles pourraient conduire à des anomalies du développement de l'enfant ou à d'autres types de désordres.

Certaines méthodes visent à améliorer le taux de succès des transferts : les cocultures et l'éclosion assistée sélective

Les techniques de culture des embryons humains avec les milieux artificiels actuellement utilisés ne permettent pas, en pratique, l'évolution jusqu'au stade de blastocyste. Le transfert de l'embryon doit donc se faire très tôt, au stade 4 à 8 cellules. Le développement jusqu'au stade de blastocyste devrait permettre un examen morphologique plus minutieux débouchant sur une sélection des embryons ayant les meilleures chances de se développer normalement *in utero* après transfert. Cette culture préalable permettrait, en effet, d'éliminer ceux des embryons incapables de parvenir normalement au stade blastocyste. Une telle sélection

a pour but principal de tenter d'augmenter le pourcentage de succès, tout en diminuant le nombre d'embryons transférés chez la mère, chacun d'entre eux ayant plus de chance d'aboutir à une grossesse normale. Certaines des équipes transférant des blastocystes obtenus par culture sur tapis cellulaire limitent à deux le nombre d'embryons transférés, réduisant donc le risque de grossesse multiple. En outre, la présélection d'embryons aptes à se développer *ex vivo* jusqu'au stade blastocyste pourrait, selon certains, améliorer la résistance à la congélation, actuellement extrêmement faible (ce qui explique la grande médiocrité des résultats obtenus aujourd'hui après transfert d'embryons congelés). Un autre objectif de certaines équipes est de pouvoir disposer d'embryons multicellulaires chez lesquels un petit nombre de cellules peuvent être prélevées à des fins de diagnostic préimplantatoire. La culture, prolongée jusqu'au cinquième jour, d'embryons humains nécessite des facteurs nutritifs ou de croissance qui sont apportés par la présence d'une sous-couche de cellules épithéliales. Deux sources de cellules peuvent être envisagées : des cellules humaines provenant de la granulosa qui entoure l'ovocyte ; elles peuvent être mises en culture au moment du prélèvement des ovocytes, mais le succès de ces cultures n'est pas régulier et leur utilisation est limitée en pratique ; des cellules provenant d'une lignée cellulaire établie : les lignées cellulaires embryonnaires humaines sont toutes fibroblastiques et ne conviennent pas à la culture d'embryon ; en l'absence de lignées cellulaires épithéliales humaines non transformées, on a recours à une lignée cellulaire épithéliale de rein de singe, les cellules Vero. La lignée cellulaire Vero a été établie en 1962 au Japon par Y. Yasumura à partir de cellules rénales d'un singe vert africain (*Cercopithecus aethiops*). Elle a été apportée par son auteur au NIH en 1964 à son 93^e passage. Les cellules utilisées par l'Institut Mérieux ont été reçues des États-Unis en 1979 à

leur 129^e passage. Les cellules utilisées pour la préparation de vaccins viraux proviennent d'un stock de cellules congelées au 137^e passage. C'est sur ce stock de cellules qu'ont été réalisés tous les contrôles sur un éventuel potentiel infectieux ou oncogène et dont les résultats négatifs ont conduit à autoriser ce stock cellulaire pour la préparation des vaccins. Quoique la société Mérieux décline toute responsabilité quant à l'utilisation de ces cellules pour la culture d'embryons humains, elles sont déjà largement utilisées à cette fin par de nombreux spécialistes des procréations médicalement assistées, notamment ceux qui ont mis au point la méthode. Mais, sous le vocable de cellules Vero, sont commercialisées des lignées ayant subi un nombre variable de passages dans différents laboratoires. Des marqueurs génétiques permettent, dans une certaine mesure, de vérifier le phénotype de ces populations variées.

Évaluation scientifique des cocultures

L'innocuité de la coculture d'embryons sur le développement embryonnaire et fœtal ultérieur semble avoir été établie par un certain nombre d'essais chez l'animal. Chez l'homme, en France, au moins douze centres de FIV pratiquent cette technique qui a abouti à des grossesses évolutives. Les premiers résultats publiés ou connus chez l'homme ne permettent pas d'affirmer que le pourcentage de succès est aujourd'hui plus grand qu'après transfert précoce. Des études rigoureusement contrôlées sont nécessaires pour apprécier le bénéfice réel de cette technique. Dans l'état actuel des connaissances, il serait hasardeux de prolonger les cocultures au-delà du 5^e jour. L'embryon éclôt à cette date et sort de la membrane pellucide qui est protectrice. Une prolongation de cette culture, de plus, risquerait de priver l'organisme maternel d'informations biologiques transmises par l'embryon à partir du 5^e jour, informations qui joueraient

un rôle dans les processus de l'implantation. Au plan théorique, la question d'une fragilité particulière du génome de l'embryon cultivé *in vitro* peut se poser. On connaît des mutations mosaïques, conséquences d'événements embryonnaires. On sait que certaines aggravations d'anomalies génétiques peuvent également survenir lors des premières mitoses de l'embryon. C'est ainsi que l'accroissement du nombre de répétitions d'un triplet nucléotidique, à la base des manifestations du syndrome de l'X fragile ou de la myotonie de Steinert se produit au cours du développement embryonnaire. Quoiqu'il n'existe à ce jour aucun argument expérimental en faveur d'une telle fragilité génétique en coculture, le problème mérite néanmoins d'être posé.

Plus critique dans l'évaluation des cocultures est la sécurité biologique pour l'embryon et pour la mère, avec le risque de contamination de la sous-couche cellulaire par des agents infectieux, mycoplasmes, virus ou autres (prions ?). Dans le cas de l'utilisation de stocks récents de cellules Vero dûment contrôlées et validées pour l'utilisation dans la production de vaccins humains, le risque semble extrêmement faible. En revanche, ce risque pourrait n'être pas mince en cas de sous-cultures multiples des cellules Vero dans le laboratoire utilisateur ou d'utilisa-

tion de cellules de source et de phénotype incertains. Dans le cas de cellules folliculaires, il n'existe *a priori* pas de risque de contamination intrinsèque. Cependant, les manipulations nécessaires à l'établissement d'une culture pourraient, en pratique, être à l'origine d'une telle contamination. De ce fait, aucune des méthodes envisagées ne semble présenter d'avantage évident sur l'autre du point de vue de la sécurité biologique. L'utilisation de milieux de culture entièrement synthétiques, contenant les facteurs de croissance nécessaires, serait, à l'évidence, préférable. A ce propos, il faut remarquer que des produits biologiques qui sont couramment utilisés dans la technique de FIV sont des produits destinés à une utilisation diagnostique dans des laboratoires de biologie et non des produits à usage humain. Certaines formes commerciales proposent les mêmes produits biologiques avec un label « usage humain » sans que soient précisés les critères de qualité utilisés. Le seul élément nettement modifié est l'augmentation importante du prix de vente. Aucun contrôle de qualité ne semble avoir été établi.

La mise au point de la technique de **l'éclosion assistée sélective** est basée sur l'hypothèse que, dans certains cas, la zone pellucide empêche l'éclosion spontanée de l'embryon, nécessaire à son implantation. Après

la fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde, il se produit au niveau de la zone pellucide une réaction appelée réaction zonale. Cette réaction semble aboutir à un durcissement de la zone pellucide qui pourrait servir à empêcher d'autres spermatozoïdes de la pénétrer après fécondation. Ce durcissement de la zone pellucide est utile pour bloquer la polyspermie, mais semble également protéger l'embryon, en particulier lors du transport dans les trompes. Une fois dans l'utérus, l'embryon atteint le stade de blastocyste, la zone pellucide s'amincit, une ouverture se produit et l'éclosion du blastocyste permet sa nidation au niveau de l'endomètre. Parmi les hypothèses retenues pour expliquer les échecs de l'implantation, J. Cohen de New York a évoqué la possibilité d'une absence d'ouverture de la zone pellucide, empêchant éclosion et implantation. On peut envisager, pour y remédier, des techniques d'ouverture artificielle dans la zone pellucide : l'une consiste à la dissoudre grâce à un milieu de culture acidifié (elle est critiquée), l'autre, mécanique, consiste à pratiquer, par micromanipulation une petite fente dans la zone pellucide ; les embryons sont remis ensuite dans le milieu de culture, observés puis transférés. D'après des informations récentes, il ne semble pas que cette technique représente un progrès important ■